

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory
Molekulární biologie a biochemie organismů



Jakub Zeman

Minoritní proteiny viru hepatitidy typu C
Novel hepatitis C virus proteins

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Václav Vopálenský, Ph.D.

Praha, 2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 09. 05. 2011

Poděkování

Děkuji tímto svému školiteli Mgr. Václavu Vopálenskému, Ph.D., za neocenitelné rady a připomínky, které mi během psaní této práce poskytl, i za zkušenosti, které mi předal při mé dosavadní práci v Laboratoři biochemie RNA na Katedře genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Obsah

Prohlášení.....	2
Poděkování.....	3
Obsah	4
Seznam použitých zkratk	5
Abstrakt.....	7
Abstract.....	7
1. Úvod.....	8
2. Genom a kódované proteiny HCV.....	10
2.1. Translace HCV	10
2.2. Replikace HCV.....	10
2.3. Majoritní proteiny HCV	10
2.3.1. Strukturní proteiny HCV	10
2.3.2. Nestrukturní proteiny HCV	11
3. Minoritní proteiny HCV	14
3.1. Varianty minoritního proteinu HCV.....	15
3.1.1. Iniclace translace na kodonech 8-11	15
3.1.2. Iniclace translace na kodonu 26.....	16
3.1.3. Iniclace translace na kodonu 42.....	16
3.1.4. Iniclace translace na kodonech 85/87	17
3.2. Vlastnosti minoritních proteinů	17
3.2.1. Lokalizace minoritních proteinů v buňce	17
3.2.2. Stabilita minoritních proteinů	18
3.2.3. <i>Core</i> protein potlačuje množství <i>core+1</i> proteinu v Huh-7 buňkách.....	18
3.2.4. Vztah <i>core</i> a <i>core+1</i> proteinů k nádorům u pacientů s hepatitidou typu C	18
3.2.5. Degradace některých minoritních proteinů nezávisle na ubiquitinaci.....	19
3.3. Obdobné alternativní proteiny jiných virů.....	20
4. Vliv sekundárních struktur RNA a <i>core+1</i> proteinu na životní cyklus HCV.....	21
4.1. Studie provedené na buněčných liniích a na modelových organismech	21
4.2. Data získaná z patientských vzorků	26
5. Diskuse.....	29
6. Závěr	31
7. Seznam citované literatury.....	32

Seznam použitých zkratk

+ssRNA virus	positive-sense single-stranded RNA virus	jednořetězcový RNA virus s pozitivním vláknem
AK	aminoacid	aminokyselina
ARF	alternative reading frame	alternativní čtecí rámec
DFC protein	double frameshifted core protein	protein vzniklý z core sekvence dvěma posuny čtecího rámce
ER	endoplasmic reticulum	endoplazmatické retikulum
GFP	green fluorescent protein	zelený fluorescenční protein
HCC	hepatocellular carcinoma	karcinom odvozený od jaterních buněk
HCV	Hepatitis C virus	Virus hepatitidy typu C
HVR	hypervariable region	hypervariabilní oblast
IRES	Internal ribosome entry site	interní vazebné místo pro ribosom
kb	kilobase	tisíc bází
kDa	kilodalton	kilodalton; 1 dalton odpovídá 1/12 hmotnosti atomu ^{12}C v základním stavu, tj. zhruba $1,66 \times 10^{-27}$ kg
NMR	nuclear magnetic resonance	nukleární magnetické resonance
NS protein	non-structural protein	nestrukturní protein
nt	nucleotide	nukleotid
NTRs	nontranslated regions	netranslatované oblasti
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámec
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase	RNA dependentní RNA polymerasa
S	Svedberg	Svedberg; jednotka popisující chování částice při sedimentaci; $1 \text{ S} = 10^{-13}$ sekund
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	elektroforesa v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsiranu sodného
SL	steam-loop	vláseňková struktura

wt

wild type

divoký typ

nukleotidy

A adenin

C cytosin

G guanin

T thymin

U uracil

aminokyseliny

Thr threonin

Trp tryptofan

Ala alanin

Phe fenylalanin

Lys lysin

Met methionin

Arg arginin

Abstrakt

Virus žloutenky typu C (HCV) je hlavním původcem chronických onemocnění jater. Po celém světě je v současnosti více než 170 milionů chronicky infikovaných osob, u více jak 100 tisíc z nich se ročně rozvine hepatocelulární karcinom. HCV náleží do čeledi *Flaviviridae* je obalený jednořetězcový RNA virus s pozitivním vláknem (+ssRNA virus), jehož genom kóduje polyproteinový prekursory, z kterého vzniká pro štěpení buněčnými a virovými proteasami 10 virových proteinů. Mimo to je však virem kódován ještě minoritní protein v alternativním čtecím rámci. Tento protein vzniká v několika možných variantách posunem čtecího rámce či iniciací translace na vnitřních startovacích kodonech. Přes deset let výzkumu není jeho role *in vivo* v současné době známa. Ukazuje se, že pro robustní virovou translaci a replikaci jsou spíše než přítomnost minoritních proteinů důležité sekundární struktury v *core* oblasti genomu HCV. Mutace narušující tyto struktury mohou mít za následek zpomalení kinetiky virového cyklu, ale i, jak naznačuje nejnovější studie, zcela neobvyklý sérologický profil u pacientů a zvýšenou míru exprese minoritního proteinu.

Abstract

The hepatitis C virus (HCV) is a major etiological agent of chronic liver diseases. More than 170 million people worldwide are chronically infected, and more than 100 thousand of them develop hepatocellular carcinoma a year. HCV is an enveloped, positive-sense single-stranded RNA virus (+ssRNA virus) of the family *Flaviviridae*. Its genome is translated to produce a single polyprotein precursor that is further processed by cellular and viral proteases to form 10 viral proteins. Moreover, there is another protein encoded in an alternative reading frame. Two alternative translation mechanisms have been proposed for expression of this alternative reading frame protein (ARFP): a frameshift mechanism and translation initiating from internal start codons. Despite ten years of research its role *in vivo* is not yet explained. It appears that secondary structures in the core encoding region of HCV genome but not ARFP expression are required for robust viral translation and replication. The results of recent studies suggest that mutations distorting these structures may result not only in slowing down the viral cycle but also in a brand new and utterly unusual serological profile in patients as well as an increased level of expression of ARFP.

Klíčová slova: *core+1* protein, virus hepatitidy typu C, HCV, iniciace translace, *core* protein, ARFP, sekundární struktura RNA

Keywords: *core+1* protein, hepatitis C virus, HCV, translation initiation, *core* protein, ARFP, RNA secondary structure

1. Úvod

Hepatitida typu C, původně zařazená do skupin „non-A, non-B hepatitis“ (NANBH), byla poprvé popsána roku 1975 u pacientů trpících posttransfusní hepatitidou (Feinstone *et al.*, 1975). Virus hepatitidy typu C (HCV) se však dlouho nedařilo izolovat vzhledem ke špatné propagaci viru v dostupných buněčných kulturách. Poprvé byl proto genom HCV získán až roku 1989 díky práci Michaela Houghtona a kolegů (Choo *et al.*, 1989).

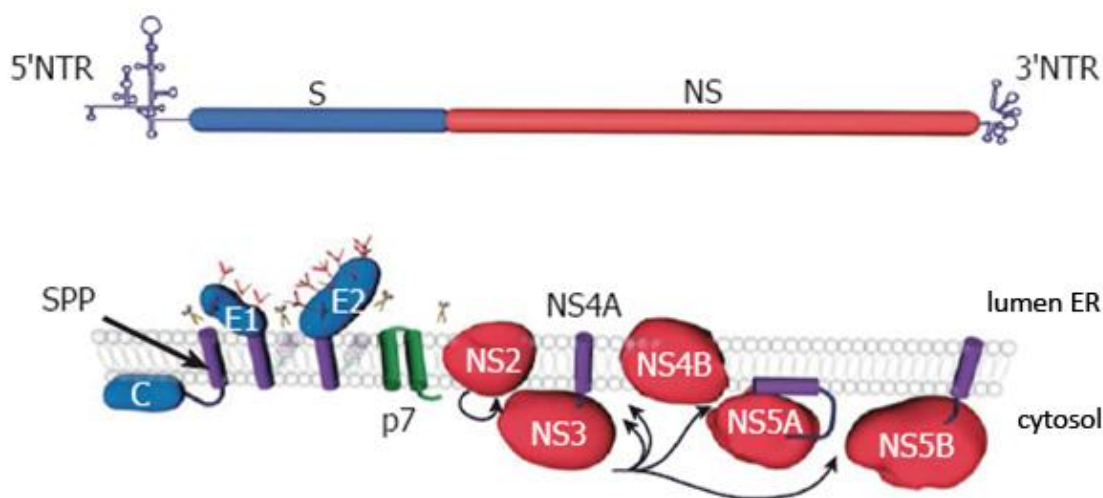
Jedná se o obalený jednořetězcový RNA virus s pozitivním vláknem (+ssRNA virus), jenž náleží do rodu *Hepacivirus* spadajícího do čeledi *Flaviviridae* (Van Regenmortel *et al.*, 2000). Jeho 9,6 kb dlouhý genom, jenž je na obou koncích ohraničen vysoce strukturovanými netranslatovanými oblastmi (NTRs), kóduje 3010 aminokyselin (AK) dlouhý polyproteinový prekursor (Obrázek 1) (Choo *et al.*, 1991). NTRs hrají důležitou roli v translaci RNA a replikaci HCV. Na 5' konci lokalizované interní vazebné místo pro ribosom (IRES) umožňuje vazbu eukaryotického iniciačního faktoru 3 (eIF3) a místa E ribosomální 40S podjednotky (pro více informací o IRES viz přehledový článek Hellen, 2009). Polyprotein je štěpen buněčnými a virovými proteasami za vzniku deseti proteinů: 4 strukturních (C, E1, E2 a p7) a 6 nestrukturních (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A a NS5B) (Bartenschlager *et al.*, 2004; Moradpour *et al.*, 2007).

Virus žloutenky typu C je hlavním původcem chronických onemocnění jater, která často vedou k steatose, cirhose a v některých případech i k hepatocelulárnímu karcinomu (HCC). Po celém světě je v současnosti více než 170 milionů osob infikovaných chronicky a ročně se u více jak 100 tisíc z nich rozvine HCC (Poynard *et al.*, 2003). Virus je šířen krví, případně krevními produkty či deriváty. Z nakažených osob se spontánně vyléčí asi 20 %, zbylých 80 % je ohroženo následky chronické infekce. V současné době však neexistuje žádná vysoce účinná a přesně cílená léčba. Pacientům je podáván pegylovaný interferon α -2a či 2b, který je stabilnější oproti nemodifikované formě, spolu s purinovým analogem ribavirinem (1- β -D-ribofuranosyl-1, 2, 4-triazol-3-karboxamid). Obě sloučeniny jsou však toxické a mají četné vedlejší účinky, navíc je nutné užívat je minimálně 6 měsíců, případně déle (Sharma, 2010). V hostitelském organismu se běžně vyskytuje současně několik sekvenčně částečně odlišných „variant“ HCV, označovaných jako quasidruhy (angl. *quasispecies*), jejichž nukleotidové sekvence se liší v rozmezí 1 až 5 % (Martell *et al.*, 1992).

Díky značné genetické heterogenitě je HCV klasifikován na sedm genotypů (1 až 7) a více jak sto subtypů (označovaných malými písmeny) (Simmonds *et al.*, 2005).

Nejrozšířenější jsou genotypy 1, 2 a 3, přičemž jsou mezi nimi rozdíly v odpovědi na léčbu a klinickém profilu (Feld a Hoofnagle, 2005), jednotlivé genotypy také podléhají geografické distribuci (Mellor *et al.*, 1995). Nejhorších výsledků je dosahováno při léčbě genotypů 1 a 4; u pacientů nakažených HCV-1 je úspěšnost léčby pouze 40-50 % (Sharma, 2010). Genetická rozmanitost a rychlost vzniku mutací odolných proti konkrétní léčbě tak představují značnou překážku ve vyvinutí léčby aplikovatelné na širokou škálu pacientů.

Mimo již uvedených strukturních a nestrukturních proteinů byl několika skupinami popsán minoritní protein kódovaný čtecím rámcem překrývajícím polyproteinový otevřený čtecí rámec (ORF) (Walewski *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001). Tento protein, označovaný často jako *core+1* protein, je syntetizován v řadě variant a vykazuje několik zajímavých vlastností. Objasnění funkce *core+1* proteinu v rámci komplexních molekulárních vztahů *in vivo* je však obtížné, už i proto, že jeho absence nikterak neovlivňuje životní cyklus viru v buněčných kulturách. Cílem mé práce je proto zmapovat nejdůležitější dostupné znalosti o variantách a vlastnostech *core+1* proteinu. Současně bych rád shrnul několik dostupných prací věnujících se sekundárním strukturám v *core* oblasti genomu HCV, které mají blízký vztah k syntéze *core+1* proteinu a ovlivňují rovněž důležité aspekty životního cyklu viru v buňce.



Obrázek 1: **Organizace genomu HCV a způsob štěpení polyproteinu na jednotlivé proteiny.**

Genom HCV obsahuje na obou koncích vysoce strukturované netranslatované úseky (NTR) a kóduje strukturní (S) a nestrukturní (NS) proteiny (nahore). Všechny proteiny jsou translatovány společně v podobě polyproteinu, který je následně štěpen několika enzymy. Na dolním obrázku je znázorněna orientace proteinů v rámci membrány endoplazmatického retikula a způsob vyštěpení z polyproteinu. Nůžky značí štěpení hostitelskou signální peptidasou, šipky naznačují štěpení komplexů NS2-3 a NS3-4A. Šipka směřující do membrány značí štěpení buněčným enzymem *signal peptide peptidase* (SPP). Topologie tranmembránových domén glycoproteinů E1 a E2 před štěpením signální peptidasou je naznačená šedě. Upraveno podle (Dubuisson, 2007)

2. Genom a kódované proteiny HCV

2.1. Translace HCV

Translace je v eukaryotních buňkách běžně spjata s 5' koncovou 7-methylguanosinovou čepičkovou strukturou, která váže iniciační faktor 4E (eIF4E) a tím následně umožňuje vazbu 40S podjednotky ribosomu na 5' konec mRNA. Molekula RNA viru hepatitidy typu C však tuto 5' koncovou strukturu neobsahuje, místo ní využívá pro zahájení translace IRES strukturu lokalizovanou v 5' koncovém NTR (Wang *et al.*, 1993). Krystalografické studie IRES struktury vázané na 40S ribosomální podjednotku a eIF3 ukázaly, že IRES může indukovat konformační změny 40S podjednotky, které následně umožňují vytvoření 80S komplexu i při absenci 5' čepičkové struktury (Spahn *et al.*, 2001; Boehringer *et al.*, 2005).

2.2. Replikace HCV

O replikaci HCV není příliš mnoho detailních informací; je stejně jako u dalších virů s +RNA genomem spjata s vnitrobuněčnými membránami (Ahluquist *et al.*, 2003). Přesné složení replikačního komplexu není známo, zajisté však obsahuje virový genom, nestrukturní (NS) proteiny a buněčné kofaktory (Tang a Grise, 2009).

2.3. Majoritní proteiny HCV

Virus hepatitidy typu C kóduje celkem 10 proteinů, z nichž jsou 4 strukturní a 6 je nestrukturních. Po naštěpení polyproteinového prekursoru vznikají následující produkty, jejichž stručný přehled je pro srovnání uveden v Tabulce 1 na straně 13:

2.3.1. Strukturní proteiny HCV

core: RNA vazebný α -helikální protein tvořící virovou nukleokapsidu. Vyskytuje se ve formě dimeru. Je vyštěpen z N-konce polyproteinu hostitelskou signální peptidasou, následným odštěpením signálního peptidu z C-konce za pomoci hostitelské *signal peptide peptidase* (SPP) vzniká maturována forma proteinu (Santolini *et al.*, 1994). N-konec *core* proteinu (cca dvě třetiny sekvence) je hydrofilní, zatímco C-konec (zbylá jedna třetina) hydrofobní, díky čemuž se *core* protein chová jako membránový protein (McLauchlan, 2000; Boulant *et al.*, 2005). Z endoplazmatického retikula (ER) je transportován do lipidových kapének

(Rouillé *et al.*, 2006). Jeho role v hostitelské buňce spočívá v ovlivnění lipoproteinového metabolismu a buněčné transformace a regulaci buněčných genů, transkripčních mechanismů, apoptosy a buněčné imunitní odpovědi (Tellinghuisen a Rice, 2002; Irshad a Dhar, 2006).

E1 a E2: Glykoproteiny, které jsou vyštěpeny buněčnou signální peptidasou (Dubuisson *et al.*, 2002), mají potenciální místa pro glykosylaci v sekvenci dobře konzervována (Goffard a Dubuisson, 2003). Jedná se o transmembránové proteiny typu I s dlouhou N-ektodoménou a C-transmembránovou doménou. Nativně se vyskytují jako nekovalentně vázané heterodimery (Deleersnyder *et al.*, 1997). E2 obsahuje dvě hypervariabilní oblasti (HVR): prvních 27 AK ektodomény tvoří HVR1 zodpovědnou za vstup viru do buňky (Callens *et al.*, 2005), HVR2 je pak pravděpodobně zodpovědná za modulaci vazby E2 na receptor CD81 (Roccasecca *et al.*, 2003).

p7: Tento malý protein o velikosti 63 AK se nachází na rozhraní strukturních a nestrukturních proteinů. Vyštěpen je opět hostitelskou signální peptidasou (Dubuisson *et al.*, 2002). Na obou koncích obsahuje dlouhé transmembránové domény; oproti dřívějším studiím (Carrère-Kremer *et al.*, 2002), které uváděly, že jsou tyto domény orientované do lumen ER, nejnovější výzkumy podložené pokročilými NMR spektroskopickými studiemi dokládají, že transmembránové domény proteinu p7 jsou orientované do cytosolu (Cook a Opella, 2010). Při studiích na umělých membránových partikulích byla objevena schopnost proteinu p7 fungovat jako iontový kanál (Griffin *et al.*, 2003). Důležitost tohoto proteinu byla prokázána při studiu infekivity HCV u šimpanzů (Sakai *et al.*, 2003).

2.3.2. Nestrukturní proteiny HCV

NS2: Jedná se o integrální membránový protein, jehož role je ve složení a uvolnění viru z buňky (Pietschmann *et al.*, 2006) a ve spoluúčasti na rozštěpení prekursoru NS2-NS3 (Pallaoro *et al.*, 2001). Ve spojení s NS3 má navíc cysteinproteasovou aktivitu (Foster *et al.*, 2010). Protein je rychle degradován proteasomem hostitelské buňky po fosforylačním označení kinasou CK2 (Franck *et al.*, 2005).

NS3 a NS4A: NS3 obsahuje N-koncovou serinproteasovou doménu a C-koncovou RNA helikasovou/NTPasovou doménu. Pro plnou proteasovou aktivitu je vyžadován jako kofaktor protein NS4A (Pang *et al.*, 2002). NS3 se váže na RNA dobře jako monomer, helikásová aktivita však vyžaduje jeho dimerizaci; teprve poté dochází k rozvíjení RNA-RNA duplexů (Serebrov a Pyle, 2004). NS3 neobsahuje transmembránovou doménu, tu získává až po vazbě NS4A. NS3-4A komplex je lokalizován v membráně ER a podobných

membránách, samotný NS4A se vyskytuje volně rozpuštěný v cytoplasmě a jádře (Wölk *et al.*, 2000). NS3-4A proteasová aktivita je zásadní pro tvorbu HCV RNA replikačního komplexu, neboť vyštěpuje z polyproteinu zbylé proteiny NS4B, NS5A a NS5B (Lindenbach a Rice, 2005). Tento komplex také zodpovídá za blokaci spuštění buněčné antivirové odpovědi (Li *et al.*, 2005). Helikasová aktivita by mohla být využívána při iniciaci RNA replikace rozvíjením stabilních vlásenkových (angl. *stem-loop*) struktur HCV RNA.

NS4B: Vysoce hydrofobní protein obsahující 4 transmembránové domény, jehož N-konec i C-konec jsou lokalizovány do cytosolu (Lundin *et al.*, 2003). NS4B transformuje hostitelské membrány do síťovitých struktur, které jsou zřejmě vyžadovány pro virovou replikaci. Nejedná se ale o jediné pozorované virové modifikace buněčných membrán za účelem replikace, je proto pravděpodobně potřeba spolupráce s dalšími virovými proteiny (Egger *et al.*, 2002). Úlohu tohoto proteinu ve virové replikaci podporuje i fakt, že mutace v nukleotidvazebném motivu, který váže a následně hydrolyzuje GTP, replikaci téměř úplně inhibuje (Einav *et al.*, 2004).

NS5A: S membránou asociovaný protein obsahující unikátní amfipatický α -helix na N-konci, který je orientovaný rovnoběžně s membránou fungující jako membránová kotva. V buňce je protein lokalizován v membráně ER (Brass *et al.*, 2002). NS5A obsahuje tři domény (označené I-III) oddělené sekvencemi o nízké komplexitě. Subdoména IA obsahuje zinkový ion koordinovaný s unikátním motivem čtyř zcela konzervovaných cysteinových zbytků, které jsou absolutně nepostradatelné pro replikaci RNA. Subdoména IB obsahuje na C-konci neobvyklou disulfidovou vazbu spojující dva cysteinové zbytky, které však zřejmě nejsou pro replikaci RNA zásadní. Doména I vytváří homodimery prostřednictvím vazby nedaleko N-konce proteinu. Vzniká tak bazický žlábek lokalizovaný do cytosolu, jenž pravděpodobně slouží jako vazebné místo pro RNA a je součástí replikačního komplexu (Tellinghuisen *et al.*, 2004; 2005). Protein se vyskytuje ve fosforylované a hyperfosforylované formě, přičemž arteficiální omezení hyperfosforylace má za následek výrazné zvýšení replikace genomu HCV (Appel *et al.*, 2005). Ukázalo se také, že NS5A interaguje s celou řadou buněčných signálních drah, kupříkladu se SNARE proteinům podobným proteinem hVAPA, funguje jako proteinkinasou A regulovaný transkripční faktor, blokuje mitogenní signalizaci či interaguje s cyklindependentní kinasou 2. (Tellinghuisen a Rice, 2002; Pezacki *et al.*, 2010)

NS5B: Jedná se o RNA dependentní RNA polymerasu (RdRp), která je nepostradatelná při replikaci HCV. Protein obsahuje C-transmembránovou doménu. Polymerasa NS5B má schopnost začít syntesu RNA *de novo*; tato schopnost byla zatím pozorována pouze *in vitro*, předpokládá se ale její výskyt i za podmínek *in vivo*. Aktivita RdRp je ovlivňována

interakcí s některými dalšími virovými proteiny, například s NS3 či NS5A (Bartenschlager *et al.*, 2004) Krystalografická struktura katalytické domény vykazuje strukturní motivy podobné jiným virovým polymerasám, jako jsou například kalicivirová, poliovirová, reovirová či polymerasa bakteriofága $\Phi 6$. (Bressanelli *et al.*, 1999; Gallei *et al.*, 2006);

Tabulka 1: Přehled proteinů kódovaných HCV.

Molekulová hmotnost byla určena pomocí SDS-PAGE. Rozdílné hodnoty u proteinů E1 a NS5A jsou dány různými metodami exprese (vyštěpení z polyproteinu nebo umělá produkce pouze daného proteinu).

Převzato z (Dubuisson, 2007).

Protein	Molekulová hmotnost [kDa]	Funkce
Core	21	RNA vazebný; tvoří nukleokapsidu
E1	31-35	Obalový glykoprotein; asociovaný s E2
E2	70	Obalový glykoprotein; receptor vazebný; asociovaný s E1
p7	7	Iontový kanál
NS2	21	Součást proteinasového komplexu NS2-3
NS3	69	N-koncová proteinasová doména; C-koncová NTPasová/helikasová doména
NS4A	6	Kofaktor proteinasového komplexu NS3-4A
NS4B	27	Indukuje změny membrány
NS5A	56-58	Fosfoprotein
NS5B	68	RNA dependentní RNA polymerasa

3. Minoritní proteiny HCV

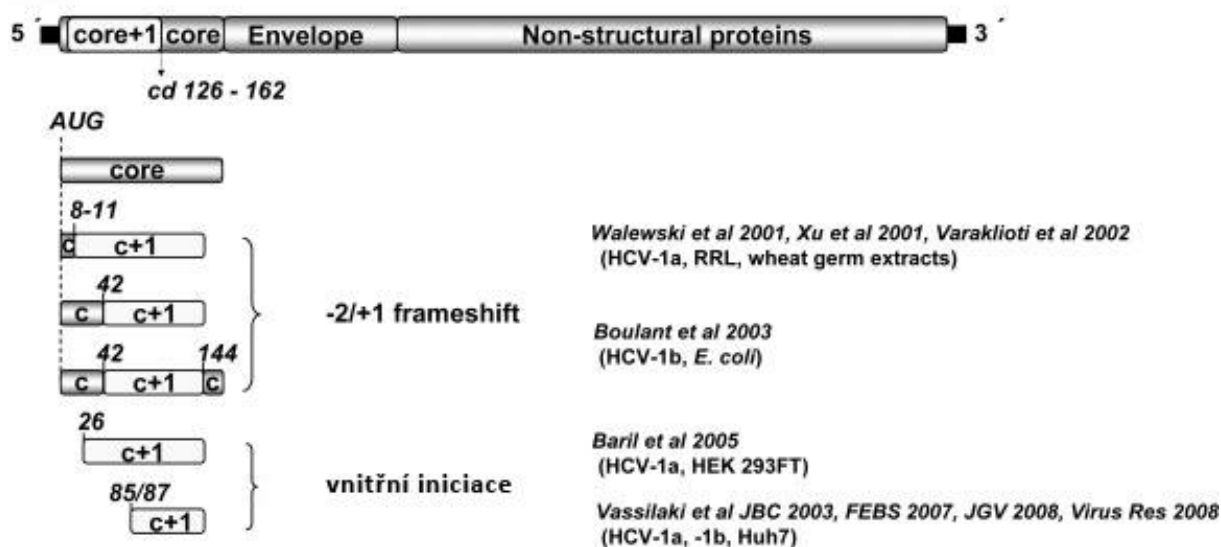
V devadesátých letech 20. století bylo publikováno několik studií, které přinesly poznatky o nově objeveném tzv. p16 proteinu (pojmenování podle velikosti 16 kDa), jenž je kódován rovněž v *core* oblasti genomu (Lo *et al.*, 1994; 1995). Počítačové analýzy různých HCV sekvencí ukázaly, že v oblasti genomu kódující *core* protein je neobvykle silně konzervována třetí báze v rámci kodonových tripletů a to více, než by bylo nutné k zachování aminokyselinové sekvence *core* proteinu. Je tomu tak díky potlačení synonymních substitucí (Ina *et al.*, 1994; Smith a Simmonds, 1997). Ina a kolegové (Ina *et al.*, 1994) publikovali ve svém článku hypotézu, že tato stabilizace je založena na existenci genu překrývajícího oblast kódující *core* protein; Smith a Simmonds (Smith a Simmonds, 1997) tento jev pro změnu vysvětlovali nutností stabilizace sekundárních struktur na molekule RNA.

První důkazy o expresi proteinu z alternativního čtecího rámce (ARF) překrývajícího *core* protein kódující oblast byly prezentovány roku 1998 (Walewski *et al.*, 1998). Tento čtecí rámec posunutý o jednu bázi (+1) oproti ORF 0 kódujícímu *core* protein byl objeven u všech sedmi genotypů HCV (Walewski *et al.*, 2001). Vzhledem k tomu, že v tomto ORF+1 čtecím rámci nebyl nalezen startovací kodon, předpokládalo se, že k translaci dochází díky ribosomálnímu posunutí čtecí fáze, tzv. *frameshiftu*, nebo na základě vnitřní iniciace translace. Na základě svých vlastností byl tento protein pojmenován jako *core+1* protein (posunutí čtecího rámce *core* genu), ARFP (*alternative reading frame protein*), F protein (od *frameshift*) nebo p17 (podle 17kDa produktu vznikajícího v infikovaných buňkách).

Několik studií prokázalo, že tento minoritní virový protein je syntetizován z iniciačního kodonu polyproteinu HCV genotypu 1a (HCV-1a). Dochází přitom k posunu čtecího rámce v oblasti kodonů 8 až 11 (vzhledem k startovacímu kodonu polyproteinu) bohaté na adenin (Xu *et al.*, 2001; Varaklioti *et al.*, 2002; Walewski *et al.*, 2002). Protilátky a buněčná imunitní odpověď vůči *core+1/F* proteinu či rekombinantním proteinům obsahujícím část sekvenční *core+1/F* proteinu byly nalezeny u pacientů infikovaných HCV (Varaklioti *et al.*, 2002; Walewski *et al.*, 2001; Komurian-Pradel *et al.*, 2004), což potvrdilo, že je tento protein exprimován také *in vivo*. Syntéza této varianty *core+1* proteinu však vyžaduje seskupení 10 adeninů v rámci kodonů 8 až 11, což je jev velice řídký; byl zaznamenán pouze u 2 genomů z 721, které jsou dostupné v internetové databázi Hepatitis Virus Database (Hepatitis Virus Database Server, 2011). Postupně tak byla získána řada dat potvrzující syntézu i dalších variant tohoto alternativního proteinu.

3.1. Varianty minoritního proteinu HCV

Syntéza *core+1* proteinu byla prokázána u velkého počtu testovaných izolátů HCV, ne všechny produkty se však shodují. Dochází totiž k syntéze různých variant tohoto proteinu v závislosti na tom, z kterého kodonu je translace iniciována (Obrázek 2) (Boulant *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2003; Vassilaki a Mavromara, 2003; Baril a Brakier-Gingras, 2005)



Obrázek 2: Schématické znázornění genomu HCV a vyznačení variant minoritního proteinu

Na otevřeném čtecím rámci kódujícím virový polyprotein (šedě) je vyznačen alternativní čtecí rámec (bíle), ze kterého jsou translatovány různé varianty minoritního proteinu. Jednotlivé varianty jsou znázorněny níže s vyznačeným iniciačním kodonem (bráno vůči startovacímu kodonu polyproteinu), mechanismem vzniku a původní studii, která o variantě informovala. V závorkách uvedený genotyp HCV, u kterého byla produkce dané varianty pozorována, a expresní systém (RRL - *rabbit reticulocyte lysate*, lyzát z králíčích retikulocytů; *wheat germ extracts* – lyzát z pšeničných klíčků; *E. coli* – *Escherichia coli*; HEK – *human embryonic kidney cells*, buněčná linie z lidských embryonálních ledvinných buněk; Huh7 - *hepatocellular carcinoma cells*, buněčná linie z lidského hepatocelulárního karcinomu).

Převzato z (Vassilaki a Mavromara, 2009).

3.1.1. Iniciace translace na kodonech 8-11

První popsanou variantou minoritního proteinu kódovaného virem hepatitidy typu C byla varianta vznikající programovaným ribosomálním -2/+1 posunem fáze na polyA kodonech 8-11 genomu HCV-1, označovaná jako *core+1/F*. Tento úsek obsahuje u HCV-1 dva možné motivy: $A_{24}AAA_{27}AAA_{30}$ a $A_{27}AAA_{30}AAC_{33}$ odpovídající sekvenci způsobující +1 ribosomální posun fáze XXXYYYYZ (kde X a Y představují adenin a Z adenin či cytosin) (Ratinier *et al.*, 2008). Mechanismus vzniku této varianty minoritního proteinu popsal

nezávisle na sobě několik skupin, jednak díky sekvenačním datům (Walewski *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001), případně pomocí mutačních studií a využití konstruktů obsahujících *core+1/F* protein fúzovaný v různých čtecích rámcích s luciferasou (Varaklioti *et al.*, 2002). Bylo též ukázáno, že může docházet k posunu čtecí fáze o -1 nukleotid, avšak se zhruba poloviční frekvencí (Choi *et al.*, 2003).

Oproti dřívějším výsledkům (Varaklioti *et al.*, 2002) ukázala studie skupiny M. Ratniera (Ratinier *et al.*, 2008), že ne u všech izolátů HCV-1 se vyskytuje sekvence 10 adeninů v oblasti kodonů 8-11 a že tento rozdíl způsobuje transkripční *slippage*, tedy vynechání či nadbytečné zařazení nukleotidu polymerasou při transkripci. Posun čtecího rámce by pak nebyl pouze následkem ribosomálního posunu čtecího rámce, ale (možná i majoritně) způsoben pozměněním sekvence při transkripci (Ratinier *et al.*, 2008).

3.1.2. Iniciace translace na kodonu 26

Jako další počátek translace *core+1* proteinu byl na genomu HCV určen kodon 26 (Baril a Brakier-Gingras, 2005). Sekvence iniciačních kodonů jsou GUG či GCG (18%, resp. 81% zastoupení v sekvencích). Bylo prokázáno, že pokud je sekvence iniciačního kodonu GCG, je k iniciaci translace potřebná IRES struktura, zatímco u kodonu GUG je vyžadována buď IRES struktura nebo 5' koncová 7-methylguanosinová čepičková struktura. Studie byla provedena s konstruktem obsahujícím prvních 28 nebo 35 kodonů polyproteinu; významnost tohoto vnitřního iniciačního místa však může významně klesnout, pokud jsou přítomny kodony 85/87 (viz Kapitola 3.1.4) (Vassilaki *et al.*, 2008a).

3.1.3. Iniciace translace na kodonu 42

Jak ukázali Boulant a kolektiv (Boulant *et al.*, 2003), při produkci *core+1* proteinu z genomu HCV-1b v *Escherichia coli* jakožto rekombinantního proteinu je možné pozorovat několik současně vznikajících variant. Vzhledem k absenci polyA úseku u genotypu HCV-1b nedochází k posunu čtecího rámce na kodonech 8-11, ale na kodonu 42, a to do +1 čtecího rámce. V +1 ORF se vyskytuje stop kodon (UAG) v pozici 144. S určitou pravděpodobností však dochází k posunu čtecího rámce na tomto kodonu o -1 a tedy zpět do čtecího rámce 0, může tak vzniknout *core+1* protein ohraničený z obou stran sekvencí běžného *core* proteinu. Průměrná pravděpodobnost posunu čtecího rámce je 2%, pravděpodobnost dvou takových událostí při syntéze jedné molekuly je pak rovna 0,04 %. Tato varianta minoritního proteinu byla proto označena jako DF či DFC protein (z angl. *double frameshifted core protein*, protein

vzniklý z core sekvence dvěma posuny čtecího rámce). Posuny čtecích rámců právě na těchto specifických kodonech jsou patrně výsledkem souhry vhodné sekvence nukleotidů (úsek GCCCCCUAG před kodonem 144) a přítomnosti sekundárních struktur směrem k 3' konci (Draper a kol., 1998 podle Boulant *et al.*, 2003).

3.1.4. Iniciace translace na kodonech 85/87

Nejkratší popsaná varianta minoritního proteinu HCV vznikající jako výsledek exprese z vnitřních iniciačních AUG kodonů 85 nebo 87 je často označována jako *core+I/S* (z angl. *short*) (Vassilaki a Mavromara, 2003). V závislosti na virovém genotypu má velikost od 38 do 76 AK. Bylo prokázáno, že *core+I/S* je nejčastěji exprimovanou variantou v savčích expresních systémech (Vassilaki *et al.*, 2007; Wolf *et al.*, 2008). Z biochemické a biofyzikální studie, kterou publikovali A. Boumlic a kolegové (Boumlic *et al.*, 2010) vyplývá, že HCV-1a a HCV-1b *core+I/S* protein vykazuje značnou míru neuspořádanosti, postrádá sekundární a terciární strukturu a má sklon k oligomerizaci. Též bylo prokázáno, že zhruba 60% pacientů nakažených HCV-1 má v séru protilátky proti HCV-1b *core+I/S* proteinu (Boumlic *et al.*, 2010).

3.2. Vlastnosti minoritních proteinů

3.2.1. Lokalizace minoritních proteinů v buňce

Core+I/F protein genotypu HCV-1a byl detekován v buňkách odvozených z lidských hepatomů (Huh7, HepG2) v cytoplasmě, v perinukleární oblasti a asociovaný s membránou ER (Roussel *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003). V některých studiích je uváděna i jaderná lokalizace (Ratinier *et al.*, 2009). V dělicích se buňkách byl *core+I/F* protein nalezen kolokalizován s tubulinem dělicího vřeténka a s mikrotubuly (Vassilaki a Mavromara, 2009). *Core+I/F* protein s deletovanými deseti N-koncovými aminokyselinami (pocházejícími z *core* sekvence) byl nalezen v mitochondriích (Vassilaki *et al.*, 2008a). Rovněž varianta vzniklá vnitřní iniciací translace na kodonu 26 je směřována do mitochondrií (Ratinier *et al.*, 2009).

Core+I/S protein vykazuje podobnou lokalizaci v buňce jako varianta *core+I/F*. Byl nalezen v cytoplasmě, kolokalizovaný s ER a v perinukleární oblasti (Vassilaki *et al.*, 2007; Vassilaki a Mavromara, 2009). Obecně vykazuje *core+I/S* protein kolokalizaci s membránami a to i přesto, že neobsahuje transmembránovou doménu. V jeho

N- i C-koncových oblastech však byly nalezeny retenční signály pro udržení v ER (v N-koncové oblasti aminokyseliny 86-89 [AlaMetArgAla] a v C-koncové oblasti úsek aminokyselin 156-159 [PheTrpLysThr]) (Vassilaki a Mavromara, 2009).

3.2.2. Stabilita minoritních proteinů

Minoritní proteiny HCV jsou za běžných *in vitro* a *in vivo* podmínek značně nestabilní a mají krátký poločas života (Xu *et al.*, 2001; Vassilaki *et al.*, 2007; Yuksek *et al.*, 2009). V buňkách jsou rychle degradovány proteasomy nezávisle na polyubiquitinaci (viz Kapitola 3.2.5) a jejich exprese je potlačována expresí *core* proteinu (viz Kapitola 3.2.3). Také četnost ribosomálního posunu čtecího rámce dosahuje u HCV průměrných hodnot pouze okolo 2 % (Boulant *et al.*, 2003). Pro zvýšení stability *core+1* proteinu za podmínek *in vitro* je používáno značení luciferasou, myc epitopem nebo jsou buňky kultivovány s inhibitorem proteasomu MG132 (Roussel *et al.*, 2003; Vassilaki a Mavromara, 2003)

3.2.3. Core protein potlačuje množství *core+1* proteinu v Huh-7 buňkách

Souběžnou expresí *core* a *core+1* proteinů v buňkách bylo zjištěno, že *core* protein potlačuje syntézu *core+1* proteinu v *trans* uspořádání, zatímco zvyšující se koncentrace *core+1* proteinu nemá téměř žádný vliv na množství *core* proteinu. Regulace exprese *core+1* proteinu zprostředkovaná *core* proteinem tak pravděpodobně není závislá pouze na iniciaci translace, ale i na posttranslačních dějích (Vassilaki *et al.*, 2007).

3.2.4. Vztah *core* a *core+1* proteinů k nádorům u pacientů s hepatitidou typu C

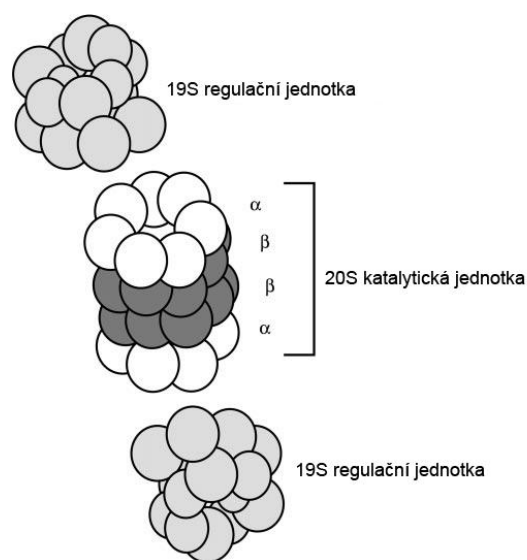
Přestože se zdá, že se v nádorech pacientů trpících hepatitidou typu C hromadí *core+1* protein (Branch *et al.*, 2005) a množství *core* proteinu je významnou měrou potlačeno (Rullier *et al.*, 2001), chybí dostatek důkazů o tom, že by právě nadprodukce *core+1* proteinu byla hlavní příčinou nádorových onemocnění u pacientů s hepatitidou typu C. Ze studie zabývající se vztahem mutací v oblasti genu kódujícího *core* protein a nádorových onemocnění vyplývá, že 60 % vzorků od pacientů s HCC obsahuje bodové mutace v oblastech aminokyselin 1 až 20 a 141 až 160. Naopak vzorky od pacientů, u kterých se HCC do té doby nevyvinul, nebyly tyto mutace téměř pozorovány. Sekvence kódující *core+1* protein je sama o sobě značně variabilní, vzorky získané z pacientů s HCC i bez něj nevykazovaly prokazatelnou míru konkrétních mutací u pacientů s výskytem karcinomu (Ogata *et al.*, 2002). Je však třeba uvést i názor vycházející z práce J. Hayashi a kolegů,

a sice že rozvoj HCC může být podmíněn abnormální hladinou alaninaminotransferasy. Mutace v genomu HCV by pak byly způsobeny snahou viru uniknout imunitní odpovědi hostitele, zároveň by došlo k autoimunitnímu poškození hepatocytů a následnému možnému rozvoji nádorových transformací (Hayashi *et al.*, 2000).

3.2.5. Degradace některých minoritních proteinů nezávisle na ubiquitinaci

Většina buněčných proteinů určených k degradaci je označena polyubiquitinovou značkou a degradována proteasomem (Glickman a Ciechanover, 2002). Nejběžnější eukaryotický 26S proteasom se skládá ze dvou hlavních částí (Obrázek 3). První z nich je aktivní 20S jednotka, která je tvořena čtyřmi kruhovými heptamerními strukturami: dvě vnější složené z α podjednotek mají regulační funkci, aby nedocházelo k volnému vstupu a degradaci jakýchkoliv proteinů, dvě vnitřní struktury tvořené β podjednotkami mají degradační schopnost (Nandi *et al.*, 2006). Druhou část proteasomu tvoří regulační jednotka, nejčastěji 19S, někdy též 11S. 19S jednotka, která má ATPasovou, polyubiquitin vazebnou, deubiquitinační a proteindenaturační aktivitu, proto slouží jako translokační aparát k degradaci označených proteinů do 20S části (Braun *et al.*, 1999; Verma *et al.*, 2004). Jednotku 19S může nahrazovat regulační 11S jednotka, která v buňce funguje jako regulátor degradace krátkých peptidů (Johnston *et al.*, 1997). Bylo ale objeveno omezené množství proteinů, které jsou proteasomem degradovány i bez ubiquitinačního značení (Sheaff *et al.*, 2000; Miller a Pintel, 2001; Kalejta a Shenk, 2003).

Yuksek a spolupracovníci (Yuksek *et al.*, 2009) ve své studii zjistili, že *core+1* protein HCV patří právě do této kategorie proteinů degradovaných nezávisle na ubiquitinaci. Použili *core+1/F* protein vznikající ribosomálním posunem čtecího rámce a vzorky cDNA z lidských jater, aby zjistili, které lidské



Obrázek 3: **Struktura 26S proteasomu.**

Katalytická 20S jednotka obsahuje dvě kopie heptameru α -podjednotek a dvě kopie heptameru β -podjednotek. Regulační 19S jednotka lokalizovaná na jednom nebo na obou koncích 20S jednotky je složena z přibližně 18 podjednotek. Katalytická jednotka se může v buňce vyskytovat rovněž jako neasociovaná s regulační podjednotkou. Alternativní 11S regulační jednotka není vyobrazena.

Převzato z (Cagney *et al.*, 2002)

proteiny jsou schopny *core+1/F* protein vázat. Všechny pozitivní vzorky kódovaly $\alpha 3$ podjednotku proteasomu. Dalšími pokusy prokázali, že *core+1/F* protein a $\alpha 3$ podjednotka jsou při expresi v Huh7 buňkách lokalizovány ve stejných částech buňky. Pomocí deleční mapování a připravení fúzních proteinů obsahujících části F proteinu a fúzované GFP určili jako zásadní oblast mezi AK 20 a 60 pro přímou vazbu na $\alpha 3$ podjednotku, neboť právě tato část F proteinu významným způsobem destabilizovala dané fúzní proteiny oproti kontrolním molekulám GFP. Navíc daná sekvence neobsahuje lysin, který funguje jako místo ubiquitinace. Přímou vazbu *core+1* proteinu na 20S část proteasomu podporují rovněž skutečnosti, že v případě inhibice 20S částice, respektive její nepřítomnosti, vykazuje F protein značnou stabilitu (Yuksek *et al.*, 2009).

Tyto popsané *core+1* proteinu vlastnosti se pochopitelně nevyskytují u variant translatovaných z kodonů 42 nebo 85/87, neboť neobsahují oblast aminokyselin identifikovanou jako krucální pro vazbu na $\alpha 3$ podjednotku 20S části.

3.3. Obdobné alternativní proteiny jiných virů

Alternativně vznikající *core+1* protein viru hepatitidy typu C není v přírodě zcela ojedinělý jev. Obdobné proteiny se vyskytují rovněž u dalších virů. Jedná se zejména o tyto virové proteiny:

N^{pro}: *classical swine fever pestivirus* (CSFV) – čeleď *Flaviviridae*, rod *Pestivirus*. Cysteinová autoproteasa vyštěpující sama sebe z *core* proteinu (Rumenapf *et al.*, 1998). Má vliv na virulenci a inhibuje produkci interferonů α a β (La Rocca *et al.*, 2005).

L: *foot-and-mouth disease virus* (FMDV) – čeleď *Picornaviridae*, rod *Aphthovirus*. Cysteinová proteasa štěpící translační iniciační faktor eIF4G v časně fázi infekce, což má za následek masívní potlačení syntézy hostitelských proteinů (Medina *et al.*, 1993).

L*: *Theiler's murine encephalomyelitis virus* (TMEV) – čeleď *Picornaviridae*, rod *Cardiovirus*. Protein hrající důležitou roli ve virové persistenci, demyelinizaci a produkci viru v makrofázích. Protein L* má rovněž antiapoptotickou aktivitu v infikovaných makrofázích (Ghadge *et al.*, 1998; Himeda *et al.*, 2005).

HBSP: Virus hepatitidy typu B (HBV) – čeleď *Hepadnaviridae*, rod *Orthohepadnavirus*. HBV protein vznikající sestřihem objevený v pokročilých onemocněních jater a persistentních infekcích. Má pravděpodobně vliv na buněčnou apoptotickou signalizaci a/nebo antivirovou aktivitu hostitele (Soussan *et al.*, 2000; 2003).

4. Vliv sekundárních struktur RNA a *core+1* proteinu na životní cyklus HCV

Kromě sekundárních struktur v koncových NTR obsahuje RNA genom HCV i další vlásenky v kódující oblasti; v genu pro NS5B lokalizovanou křížovou strukturu (angl. *cruciform*) a v *core* oblasti se vyskytující vlásenkové struktury (*stem-loop*, SL).

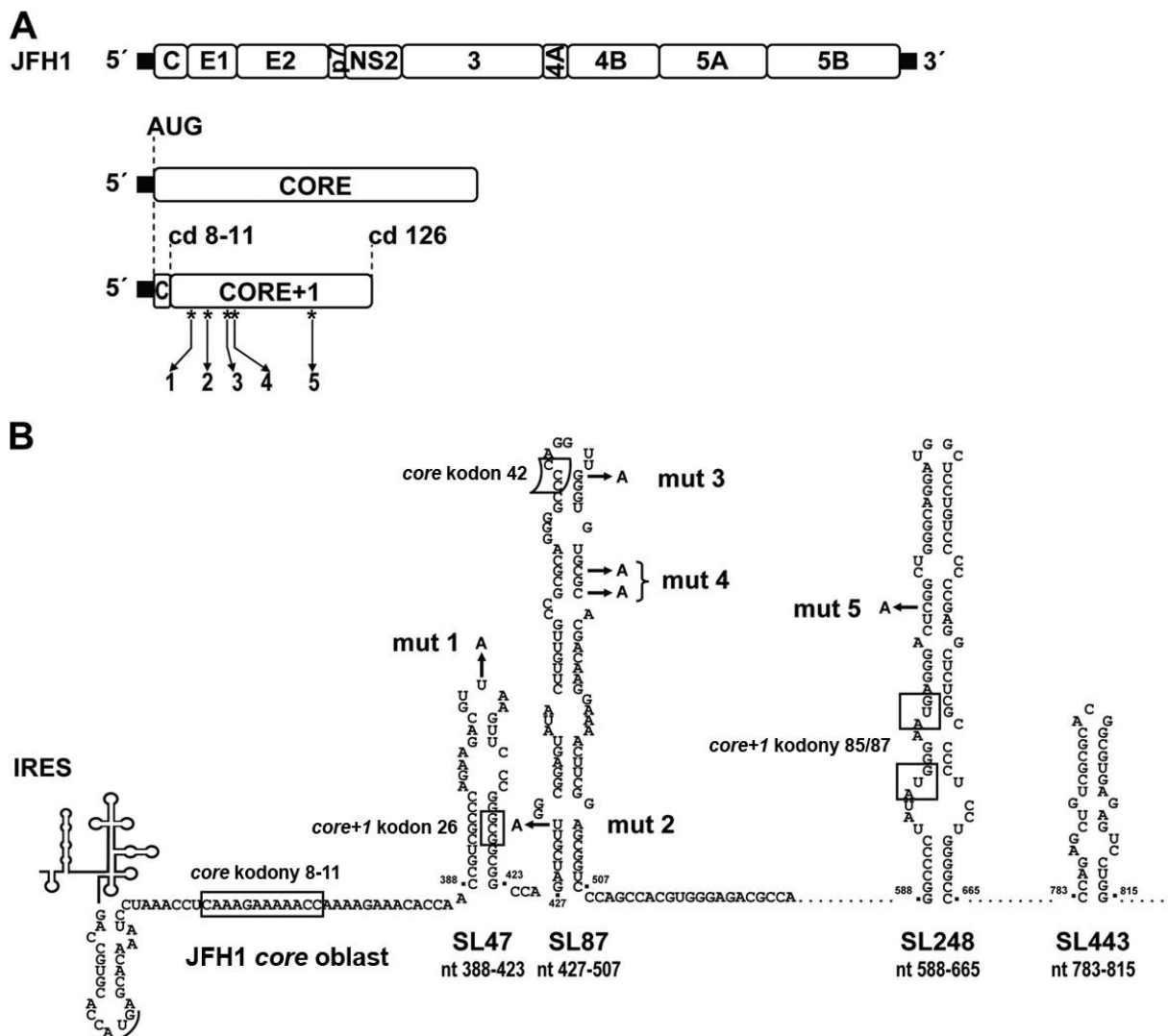
Skupinou A. Tuplina (Tuplin *et al.*, 2002; 2004) byly identifikovány v *core* oblasti následující vlásenkové struktury (pozice vlásenek uváděna od 5' konce genomu HCV izolátu JFH1): **SL47** (nukleotidy [nt] 388 až 423), **SL87** (nt 427 až 507), **SL248** (nt 588 až 665) a **SL443** (nt 783 až 815).

4.1. Studie provedené na buněčných liniích a na modelových organismech

Aby bylo možno studovat vliv sekundárních struktur a *core+1* proteinu na životní cyklus viru, bylo do genomu HCV zavedeno skupinou N. Vassilaki (Vassilaki *et al.*, 2008b) šest bodových mutací v pěti místech, které jednak narušily párování dvouřetězcových úseků a jednak vytvořily nové stop kodony v +1 čtecím rámci (viz Obrázek 4). **Mutace 1** (kodon 22, uracil nahrazen adeninem) brání translaci *core+1/F* proteinu vzniklého ribosomálním posunem čtecího rámce na kodonech 8-11 a ovlivňuje strukturu terminální smyčky SL47; **mutace 2** (kodon 31, uracil nahrazen adeninem) brání translaci z kodonu 26 a narušuje párování v SL87; **mutace 3** (kodon 44, guanin nahrazen adeninem) a **mutace 4** (kodony 46 a 47, v obou nahrazen cytosin adeninem) brání translaci z kodonu 42 a terminují případnou translaci ze všech předchozích možných míst, navíc narušují horní část SL87; **mutace 5** (kodon 90, cytosin nahrazen adeninem) byla navržena s ohledem na terminaci translace *core+1* proteinu z kodonů 85/87 a všech jeho ostatních variant, kromě toho došlo k narušení párování ve smyčce SL248. Vnesené mutace však neovlivnily aminokyselinovou sekvenci *core* proteinu.

Genom HCV izolátu JFH1 obsahující všech pět mutací vykazoval 24 hodin po transfekci buněk oproti divokému typu (*wild type*, wt) stejného genotypu šestinásobnou prodlevu v replikaci a virové produkci. Po 48 hodinách po transfekci se již hodnoty replikace a virové produkce shodovaly u obou variant. Stejně pozměněnou kinetiku virového cyklu vykazoval tento genom, i pokud byl použit pro transfekci buněk stabilně exprimujících *core+1* protein. Naopak genom obsahující pouze mutaci 5 nevykazoval žádné odchylky

od wt replikační a infekční kinetiky. Změny jsou proto jasně dané ovlivněním sekundárních struktur, nikoliv nepřítomností *core+1* proteinu. Tyto mutace byly v genomu stabilní i po 4 týdnech od transfekce buněk (Vassilaki *et al.*, 2008b).



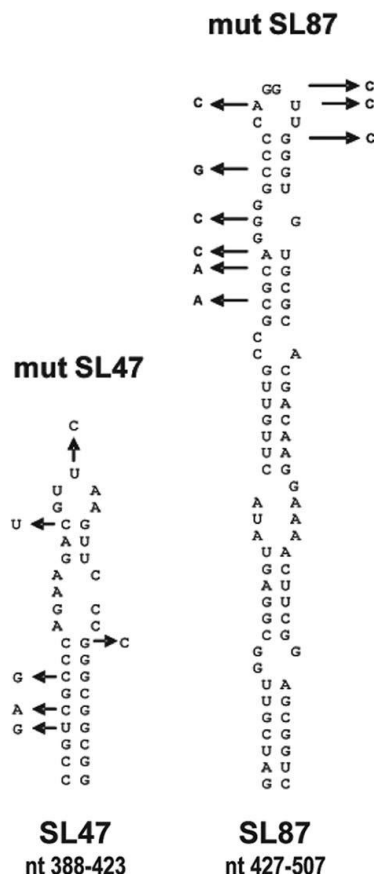
Obrázek 4: **Identifikované sekundární struktury genomové RNA HCV a vnesené bodové mutace.** (A) Schematické znázornění wt genomu HCV izolátu JFH1. 5' a 3' koncové NTR jsou vyznačeny černými čarami. Pomocí hvězdiček a šipek jsou vyznačeny uměle vnesené bodové mutace, přerušované čáry označují pozici iniciačního kodonu polypeptidu, kodony 8-11, na kterých dochází k posunu čtecího rámce, a kodon 126, na kterém je syntéza *core+1* proteinu terminována. (B) Vyznačení vnesených mutací v rámci sekundárních vlásenkových struktur. Všechny mutace byly navrženy tak, aby vytvořily stop kodon v čtecím rámci *core+1* proteinu. S výjimkou mutace 1 narušují ostatní mutace intramolekulární párování a tím strukturu vlásenek. Mutace 4 se skládá ze dvou bodových mutací. Vnesením mutací nedošlo k narušení aminokyselinové sekvence *core* proteinu. Obdélníky jsou vyznačena místa, na kterých začíná syntéza popsaných variant *core+1* proteinu. Čísla nukleotidů (nt) jsou vztažena k HCV izolátu JFH1. Převzato z (Vassilaki *et al.*, 2008b).

Zavedením dalších mutací do SL47 a SL87 bylo dosaženo značných změn v sekundární struktuře, avšak opět bez zásahů do aminokyselinové sekvence oblasti *core* proteinu (Obrázek 5). Takto upravený genom vykazoval 24 hodin po transfekci čtyřikrát nižší replikační rychlost než wt genom a téměř desetkrát nižší infektivitu. Obě sekundární struktury jsou tedy důležité pro efektivní replikaci v buněčné kultuře. Obdobnou modifikací SL248 a SL443 bylo zjištěno, že tyto sekundární struktury nijak neovlivňují replikaci RNA či infekční titr (Vassilaki *et al.*, 2008b).

Na genomu HCV izolátu JFH1 nesoucím mutace ve vlásenkách SL47 a SL87, jehož replikaci bylo zamezeno delecí 10 kodonů z genu pro NS5B, bylo prokázáno, že stabilita virové RNA není ovlivněna přítomností těchto vlásenek. Jejich účast se však zdá být zásadní pro účinnou translaci, neboť pozměnění jejich sekundární struktury o polovinu snížilo množství translatovaných proteinů (Vassilaki *et al.*, 2008b).

Genom obsahující mutace v obou vlásenkách SL47 i SL87 vykazoval stejné změny v translaci i replikaci, jako genomy nesoucí mutace pouze v jedné z nich. Z toho vyplývá, že při těchto dějích je nejspíše využíváno vazby RNA-RNA, resp. RNA-protein, a je potřeba, aby obě vlásenkové struktury byly funkční současně (Vassilaki *et al.*, 2008b).

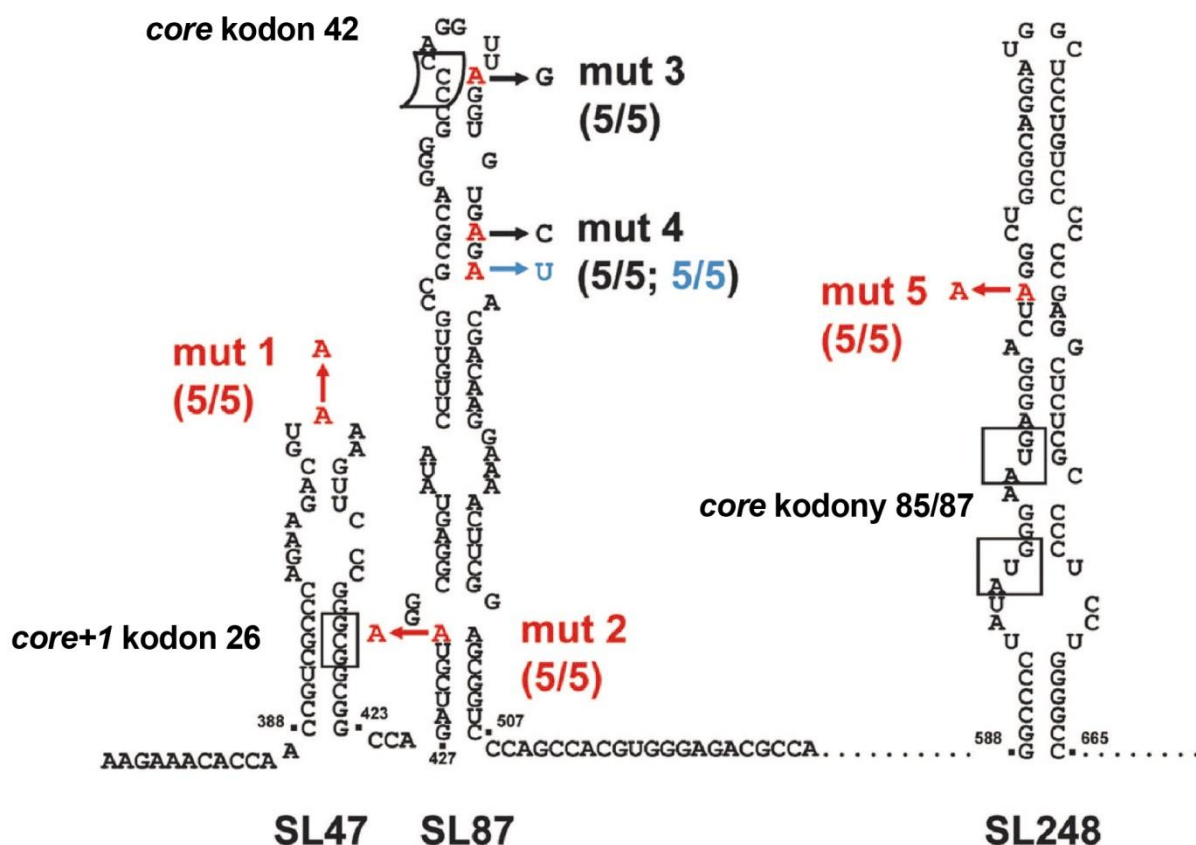
Pro ověření závěrů *in vivo* bylo použito myšího kmenu uPA-SCID. Jedná se o imunodeficientní transgenní jedince s xenotransplantátem primárních lidských hepatocytů permissivních pro HCV (Meuleman a Leroux-Roels, 2008). Tyto myši byly naočkovány inokuly obsahující buď wt genom JFH1 HCV, nebo genom JFH1 nesoucí všech pět výše popsaných mutací, případně genom JFH1 nesoucí pouze mutaci 5. Myši infikované wt genomem a genomem s mutací 5 vykazovaly vysokou koncentraci HCV RNA v krvi, zatímco myši infikované inokulem obsahujícím genom se všemi pěti mutacemi měly hladinu HCV RNA v krvi dlouhodobě pod detekčním limitem. Srovnatelná hladina virové RNA



Obrázek 5: **Mutace ve vlásenkách SL47 a SL87 sloužící k rozvolnění sekundárních struktur.**

Při následných experimentech bylo do vlásenek SL47 a SL87 HCV izolátu JFH1 vneseno několik mutací (označeny šipkami), které zcela rozrušily sekundární strukturu v daných částech vlásenek. Převzato z (Vassilaki *et al.*, 2008b).

byla u viru se všemi pěti mutacemi pozorována s 2-4týdenním zpožděním oproti běžné infekci. Bylo tak ověřeno, že pro efektivní replikaci *in vivo* v daném modelu je zapotřebí sekundárních struktur v *core* oblasti genomu, nikoliv přítomnost *core+1* proteinu. Vzhledem k tomu, že infektivita genomu nesoucího všech pět mutací nakonec dosáhla úrovně běžné infekce, byly z dané myši izolovány vzorky RNA a testovány za účelem zjištění reverzí vedoucích k potlačení vnesených mutací. Mutace 1, 2 a 5 byly ve vzorcích konzervovány, mutace 3 byla revertována, mutace 4 byla v jedné bázi (kodon 46) revertována a v druhé (kodon 47) zaměněna za zcela jinou bázi (Obrázek 6). Z uvedených výsledků tedy vyplývá, že pro virus je důležitější sekundární struktura SL87, neboť mutace v její horní byly revertovány na původní wt sekvenci a došlo tím k obnovení struktury vlásenky SL87 (Vassilaki *et al.*, 2008b).

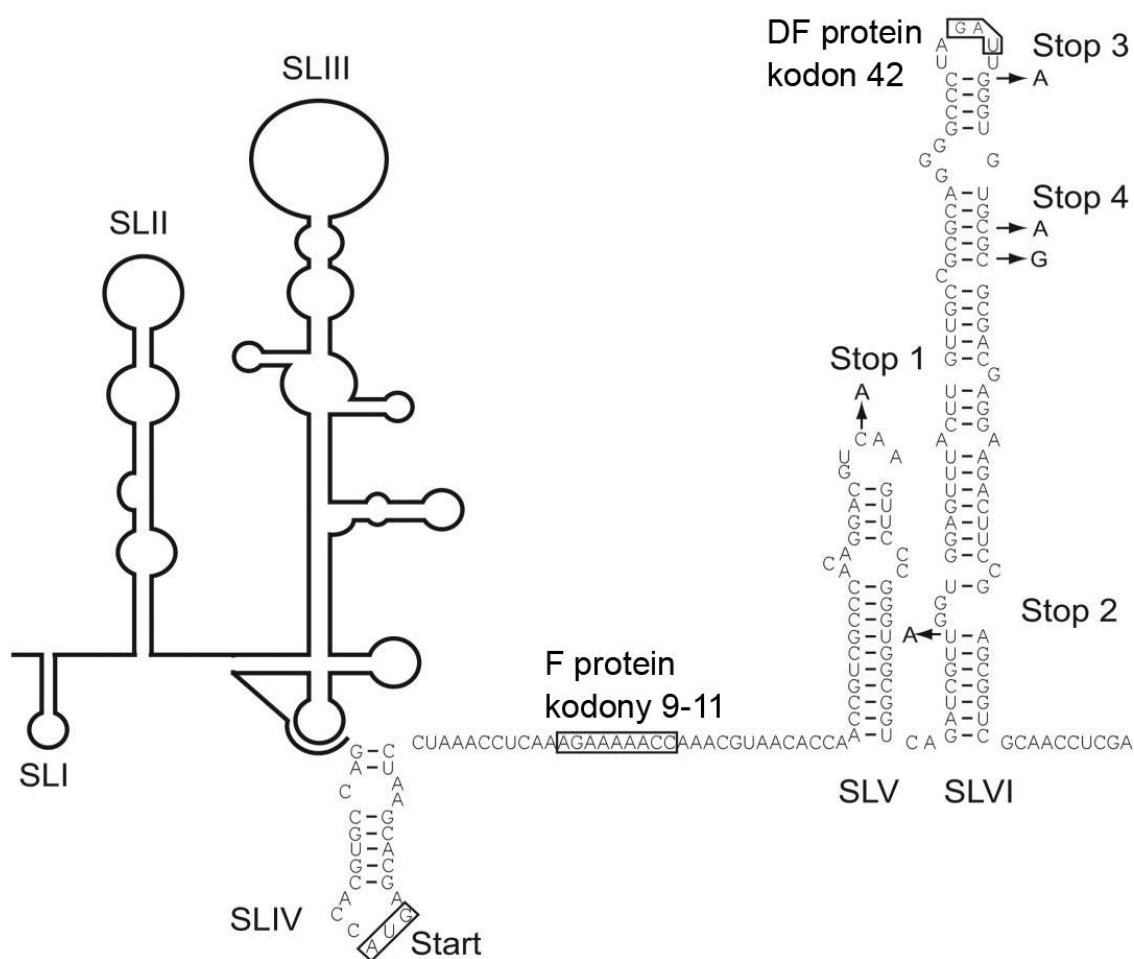


Obrázek 6: Výsledek sekvenční analýzy vzorků získaných z myši infikované virem nesoucím všech pět mutací v genomu HCV izolátu JFH1.

Mutované báze jsou označeny červeně, šipkou báze nalezené ve vzorcích z myšního séra. Celkem bylo analyzováno pět nezávislých vzorků, u všech byly výsledky sekvenačních testů shodné. Mutace 1, 2 a 5 byly ve vzorcích konzervovány. U mutace 3 došlo k reverzi na původní bázi wt genomu. U mutace 4 byla báze v kodonu 46 revertována, báze v kodonu 47 byla zaměněna za zcela jinou bázi (označeno modře).

Převzato z (Vassilaki *et al.*, 2008b).

Obdobných výsledků dosáhli i McMullan a spolupracovníci (McMullan *et al.*, 2007). Tato skupina však zkoumala pouze sekundární struktury SLV a SLVI odpovídající SL47 a SL87. V těchto strukturách použili mutace ve stejných místech jako výše zmíněná skupina (Obrázek 7) (Vassilaki *et al.*, 2008b). Nebylo tak zabráněno možné translaci z kodonů 85/87 lokalizovaných na vlásenkové struktuře SL248. Obě studie určily strukturu SL87 jako důležitou pro robustní replikaci, z výsledků Vassilaki a kolegů (Vassilaki *et al.*, 2008b) však vyplývá, že minimálně v buněčné kultuře je vyžadována současná funkčnost a struktura vlásenky SL47.



Obrázek 7: Bodové mutace vnesené do genomu HCV izolátu H77 použité ve studii skupiny L. K. McMullan (McMullan *et al.*, 2007).

Genom HCV izolátu H77. Čarou naznačeny IRES struktury, dále *core* kódující oblast s vlásenkovými strukturami SLV a SLVI. Zvýrazněn startovací kodon virového polyproteinu, polyA oblast kodonů 9-11 a místo posunu čtecího rámce při syntézy DFC varianty minoritního proteinu. Mutace (Stop 1-4) označeny šipkou a příslušným nukleotidem.

Převzato z (McMullan *et al.*, 2007).

Další odlišností bylo použití laboratorního šimpanze jako modelového organismu skupinou L. K. McMullan (McMullan *et al.*, 2007). Po infekci genomem odvozeným z izolátu H77 (HCV-1a) nesoucím všechny čtyři mutace u něj byly pozorovány velmi slabé příznaky infekce, bez poškození jater. Izolované vzorky viru vykazovaly reverze vedoucí k částečnému obnovení původní sekvence, konkrétně v mutacích 3 a 4 (Obrázek 8). Sérií pokusů s buněčnými liniemi Huh-7.5 bylo zjištěno, že genom nesoucí mutace 1, 2 a 4 dosáhl zhruba 18 % úrovně replikace wt vzorku a genom nesoucí mutace 1 a 2 (stav pozorovaný na konci pokusu *in vivo*) vykazoval úroveň replikace zcela shodnou s wt vzorkem (McMullan *et al.*, 2007).

	Stop 1	Stop 2	Stop 3	Stop 4
Stop 1,2,3,4	GGACGU <u>AA</u> AGU...UCGU <u>AG</u> GUG...GAUU <u>AG</u> GUGUG <u>AG</u> GGCG			
Týden 1
Týden 2	G.....
Týden 10	{.....	G.....	C.....
Týden 20	G.....	C.....
Týden 40	G.....	C.C...
H77	GGACGU <u>CA</u> AGU...UCGU <u>UG</u> GUG...GAUU <u>GG</u> GUGUG <u>Cg</u> CgCG			
Nukleotid	407	434	473	480 482

Obrázek 8: **Změny sekvence HCV RNA ze séra šimpanze v závislosti na čase.**

V horním řádku je uvedena sekvence mutovaného genomu v místech mutací, označených jako „Stop“, ve spodním řádku je pak původní wt sekvence HCV izolátu H77. Uprostřed jsou vyznačeny změny bází v průběhu týdnů. V 10. Týdnu byly pozorovány dvě paralelní skupiny vzorků – jedna s reverzí v prvním kodonu mutace 4, druhá bez ní. Při pozdějších testech byla již tato reverze pozorována u všech testovaných vzorků.

Upraveno podle (McMullan *et al.*, 2007).

4.2. Data získaná z patientských vzorků

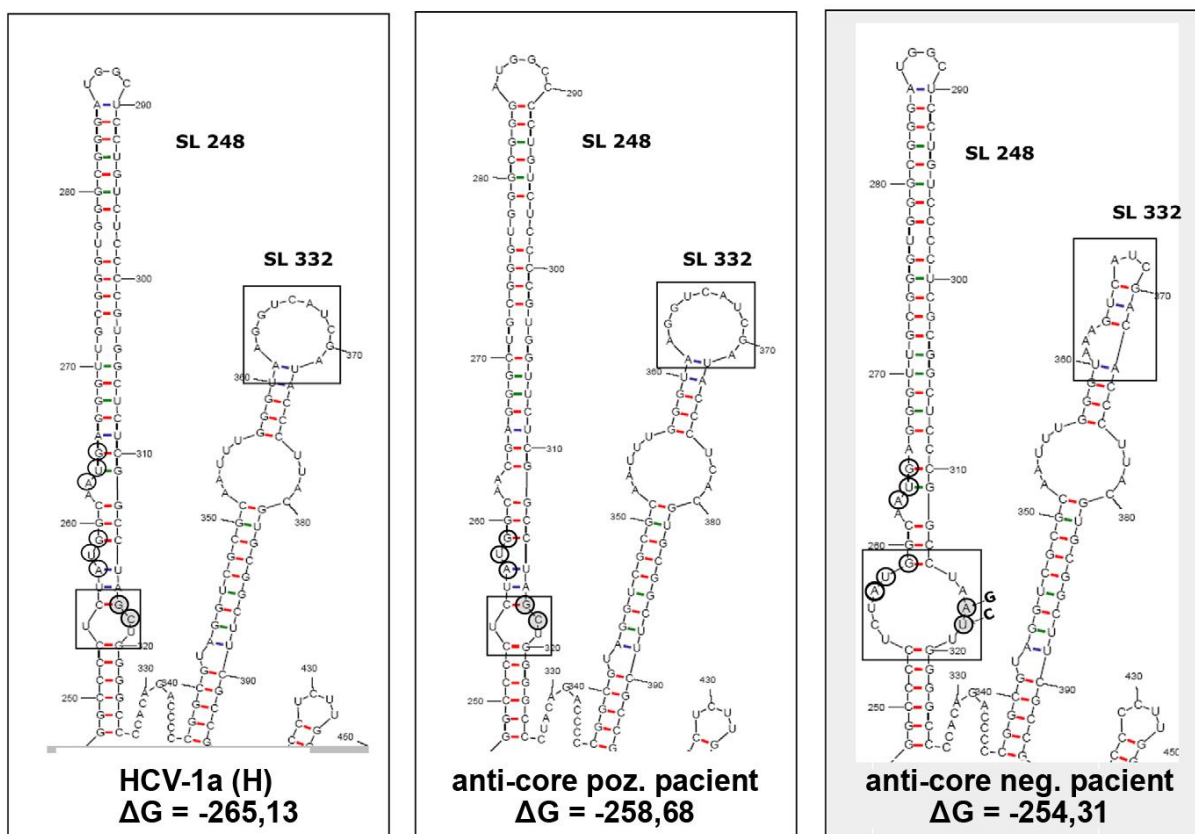
Mutace v *core* regionu byly dány do kontextu s klinickým profilem dárců z Kambodžského království ve studii A. Budkowske a kolegů (Budkowska *et al.*, 2011). Ze vzorků od 87 pacientů bylo jako HCV pozitivních určeno 58. Pozitivní séra byla testována na přítomnost *core* a *core+1* protilátek. U tří pacientů infikovaných HCV-1a byla zjištěna nepřítomnost protilátek vůči *core* proteinu. Séra osmi pacientů vykazovala přítomnost protilátek proti *core+1* proteinu, z toho pět bylo nakaženo HCV-6 a tři HCV-1a. Zdaleka nejvyšší hladina *core+1* protilátek byla zaznamenána právě u těch tří pacientů, kteří nevykazovali reaktivitu s *core* proteinem. Tato trojice rovněž shodně nevykazovala

přítomnost protilátek vůči sekvenci získané z NS5B, naopak hladina *core* antigenu se u každého z nich lišila (Budkowska *et al.*, 2011).

Byla provedena analýza nukleotidové a aminokyselinové sekvence anti-*core* pozitivních i negativních pacientů a nebyly nalezeny žádné substituce v oblasti AK 9-11. V případě tří pacientů s neobvyklým sérologickým profilem se tak nejednalo o mutaci v polyA oblasti, na které dochází k posunu čtecího rámce při syntéze *core+1/F* proteinu. Majoritní část zjištěných mutací (7/10) se vyskytovala v oblasti AK 99-124 kódující *core+1/S* protein a jednalo se o synonymní mutace ovlivňující třetí nukleotidy kodonů. Zbylé mutace byly pozorovány na nukleotidech 223 a 314. Vzorky od všech tří anti-*core* negativních pacientů vykazovaly zcela shodné mutace (Budkowska *et al.*, 2011).

Ze vzorku jednoho anti-*core* negativního pacienta byla izolována *core* sekvence a *core* protein byl exprimován v buňkách savčí buněčné linie. Takto získaný protein nesoucí mutace vykazoval běžnou velikost 21 kDa a byl rozpoznán polyklonální protilátkou cílenou proti jeho N-konci. Protilátky ze sér anti-*core* negativních pacientů jsou tak zřejmě zcela netypické, vyskytují se v nízkých koncentracích a rozpoznávají C-koncovou část *core+1* proteinu. Podobně byla získána mutace obsahující sekvence RNA kódující *core+1* protein ze vzorku anti-*core* negativního pacienta. Minoritní protein byl označen luciferasou (LUC), což zároveň zvýšilo stabilitu výsledného fúzního proteinu. Následná transientní exprese *core+1*-LUC fúzního proteinu byla více jak 2,5násobně vyšší, než exprese *core+1* proteinu z modelového genomu HCV-1a (Budkowska *et al.*, 2011).

Kromě sekvenční analýzy byla provedena i analýza strukturní. Překvapivě nejvíce byla u anti-*core* negativních pacientů v porovnání s HCV-1a prototypem H pozměněna vlásenková struktura SL248. Zvýšené zastoupení GC párů v nukleotidech 317 a 318 změnilo RNA strukturu a posunulo iniciační kodon 85 z dvojřetězcového úseku do oblasti smyčky. Další změny ve struktuře SL337 zredukovaly velikost koncové smyčky v horní oblasti struktury (Obrázek 9) (Budkowska *et al.*, 2011).



Obrázek 9: Porovnání struktury prototypu H genomu HCV-1a s genomem *anti-core* pozitivního a *anti-core* negativního pacienta.

Vlevo prototyp H genomu HCV-1a, uprostřed genom *anti-core* pozitivního pacienta a vpravo genom *anti-core* negativního pacienta. Čtverci jsou označeny mutacemi nejvíce pozměněné struktury. Kruhy bez výplně jsou označeny vnitřní iniciační kodony 85 a 87. Šedými kruhy jsou vyznačeny nukleotidy, které jsou mutované u *anti-core* negativního pacienta (AU místo GC). ΔG vyjadřuje standardní změnu volné Gibbsovy energie struktury.

Upraveno podle (Budkowska *et al.*, 2011).

5. Diskuse

Virus hepatitidy typu C obsahuje ve svém genomu dvě oblasti, kde může docházet k ribosomálnímu posunu čtecího rámce (kodony 8-11 a kodon 42). Navíc HCV obsahuje vnitřní iniciační kodony 26 a 85/87. Na těchto místech může být zahájena translace různých variant minoritního proteinu. Nejdelší varianta minoritního proteinu, *core+1/F* protein, vzniká ribosomálním posunem čtecího rámce na polyA oblasti kodonů 8-11, případně na základě tzv. *slippage*, kdy polymerasa zařadí do této oblasti o jeden nukleotid více či méně a tím zpění čtecí rámec vznikajícího proteinu. Na vnitřním iniciačním kodonu 26 začíná translace druhé nejdelší varianty *core+1* proteinu. Obě tyto varianty obsahují ve své sekvenci úsek aminokyselin zásadní pro přímou vazbu na 20S katalytickou jednotku proteasomu (Yuksek *et al.*, 2009), všechny ostatní varianty *core+1* proteinu jsou naopak degradovány jiným, na ubiquitinaci nezávislým mechanismem. Minoritní protein vznikající ribosomálním posunem čtecího rámce na kodonu 42 byl popsána u HCV-1b a vzniká v řadě variant; majoritní jsou však dvě: u jedné dochází k posunu čtecího rámce na kodonu 42 v -2/+1 smyslu a terminaci na stop kodonu 144; u druhé na stop kodonu 144 dochází k opětovnému posunu čtecího rámce zpět do ORF *core* proteinu. Nejkratší popsanou variantou minoritního proteinu u HCV je *core+1/S* protein vznikající vnitřní iniciací translace na kodonech 85/87. Jak se ukazuje, *core+1/S* protein je nejčastěji exprimovanou variantou z genomů řady genotypů HCV (Vassilaki *et al.*, 2007; Wolf *et al.*, 2008).

Vnitřní iniciační kodon 26 pro syntézu *core+1* proteinu byl původně popsán při použití úseku prvních 28 nebo 35 kodonů virového polyproteinu jako templátu pro syntézu *core+1* proteinu (Baril a Brakier-Gingras, 2005). Důležitost tohoto iniciačního místa však může značnou měrou klesnout v případě, že jsou přítomny kodony 85/87, které jsou nejčastějším místem iniciace translace *core+1* proteinu v savčích expresních systémech (Vassilaki *et al.*, 2007).

Z nejnovější studie provedené na genotypu HCV-1b (Boumlic *et al.*, 2011) také vyplývá, že posun čtecího rámce na kodonu 42 (Boulant *et al.*, 2003) mohl být v původní studii zkreslen použitím *E. coli* pro expresi F/DFC proteinu. Dle nových poznatků dochází u tohoto genotypu k iniciaci translace kromě kodonů 85/ 87 a minoritně kodonu 26 rovněž z nově objeveného kodonu 58, u něhož nebyla tato funkce dříve popsána (Boumlic *et al.*, 2011).

Mnohé proteiny účastníci se buněčné signalizace a regulace mají díky své neuspořádanosti možnost vázat velké množství proteinů (Uversky, 2002). Značná míra neuspořádanosti *core+1/S* proteinu (Boumlie *et al.*, 2010) tak podporuje myšlenku, že i tato varianta minoritního proteinu by mohla reagovat *in vivo* s celou řadou buněčných proteinů a pro virus příznivě ovlivňovat chování hostitelského organismu.

Problematický je i experiment využívající *core+1/F* protein s deletovanými deseti N-koncovými aminokyselinami jako modelu minoritního proteinu (Komurian-Pradel *et al.*, 2004; Troesch *et al.*, 2005). V pozdějších experimentech (Vassilaki *et al.*, 2008a) bylo zjištěno, že tento uměle připravený protein vykazuje pro *core+1/F* protein nezvyklou mitochondriální lokalizaci. Pakliže byl tento protein používán jako model namísto *core+1/F* proteinu o plné délce, mohlo dojít ke zkreslení následně učiněných závěrů.

Přímá vazba *core+1* proteinu na 20S jednotku proteasomu a degradace nezávislá na ubiquitinaci naznačují, že varianty minoritního proteinu mající počátek na kodonech 8-11 a 26 by se mohly účastnit regulace proteinové degradace svou vazbou na 20S jednotku proteasomu a bránit tak sestavení 26S proteasomového komplexu v buňce, čímž by chránily ostatní virové proteiny před degradací hostitelskou buňkou.

Dalším důležitým zjištěním je, že integrita vlásenek SL47 a SL87 je zásadní pro regulaci aktivity IRES struktury prostřednictvím RNA-RNA interakcí, neboť úsek nukleotidů 428-442 SL87 je komplementární k úseku nukleotidů 24-38 v 5' NTR (Kim *et al.*, 2003). Na případnou úlohu těchto vlásenek ve vazbě buněčných proteinů lze usuzovat podle schopnosti SL47 vázat některé buněčné faktory, jako NSAP1, který je značně homologní s lidským heterogenním jaderným ribonukleárním proteinem (hnRNP) a který podporuje translaci pomocí IRES struktur. Obě vlásenkové struktury by se také mohly účastnit tvorby komplexní struktury tvořené celou genomovou molekulou RNA, čímž by se mohl genom chránit proti obranným mechanismům buňky (Simmonds *et al.*, 2004).

Sporná je role *core+1* proteinu při rozvoji HCC. Jak bylo ukázáno, *core+1* protein se sice hromadí v nádorech pacientů trpících hepatitidou typu C (Branch *et al.*, 2005) a potlačuje množství *core* proteinu (Rullier *et al.*, 2001), nevykazuje ale prokazatelnou míru konkrétních mutací u pacientů s výskytem karcinomu (Ogata *et al.*, 2002). Dáno do kontextu s výzkumem A. Budkowske a spolupracovníků (Budkowska *et al.*, 2011), zdá se, že nadprodukce *core+1* proteinu by mohla být přímým důsledkem mutací v *core* protein kódující oblasti genomu HCV. K poškození hepatocytů a následnému rozvoji nádorových transformací by docházelo u jedinců s abnormální hladinou alaninaminotransferasy autoimunitně (Hayashi *et al.*, 2000).

6. Závěr

Bylo ukázáno, že virus hepatitidy typu C kóduje několik variant svého minoritního proteinu s řadou zajímavých vlastností exprimovaného z alternativního čtecího rámce. Výběr exprese jednotlivých variant virového minoritního proteinu je dán genotypem HCV, mutacemi v konkrétním genomu a zřejmě i dalšími podmínkami exprese. Existence proteinu kódovaného v alternativním čtecím rámci není ale u HCV v rámci ostatních virů nikterak ojedinělá. S dnešními znalostmi je však těžké posoudit význam minoritních proteinů pro HCV, neboť se zdá, že dochází k syntéze řady variant s mírně odlišnými vlastnostmi a jejich syntéza může být ovlivněna mutacemi ve virovém genomu. Objasnění úlohy *core+1* proteinu *in vivo* ovlivňuje kromě nízké úrovně exprese a absence vhodného modelu také to, že tento minoritní protein může ovlivňovat životní cyklus viru v buňce tak, že ho není možné studovat ve vysoce permisivních buněčných liniích, či může též ovlivňovat geny, které jsou v buňkách linií mutované. Význam tohoto minoritního proteinu pro HCV je také dost možná v modulaci imunitní odpovědi hostitele, úpravě buněčného cyklu a ovlivnění buněčných dějů nepříznivých pro virus.

Vlásenkové struktury, které byly objeveny v *core* oblasti genomu, se zdají být pro virus důležité, minimálně pokud je vystaven jistému selekčnímu tlaku, který vede k reverzním mutacím a (alespoň částečně) k obnově sekundární struktury. Studie, kterou publikovali L. K. McMullan a kolegové (McMullan *et al.*, 2007), a studie skupiny N. Vassilaki (Vassilaki *et al.*, 2008b), ukázaly, že mutace narušující sekundární struktury v *core* oblasti mají za následek nižší infektivitu daného genomu a že tento je v *in vitro* podmínkách částečně revertován na svou původní nukleotidovou sekvenci. Studie skupiny A. Budkowske (Budkowska *et al.*, 2011) ale ukázala, že mutace v *core* oblasti genomu můžou být v určitých případech u pacientů konzervovány a způsobovat neobvykle vysokou expresi *core+1* proteinu ve spojitosti s produkcí neobvyklých protilátek vůči *core* proteinu.

V následujícím výzkumu by proto bylo potřeba dokonale popsat podmínky exprese jednotlivých variant a jejich rozdílné vlastnosti a na základě toho pátrat po možných vazebných interakcích virových minoritních proteinů se strukturami a molekulami hostitelské buňky. Tyto závěry, dány do kontextu se získanými strukturními daty ze vzorků od pacientů, by mohly vést ke konkrétnějším představám o funkcích daných variant minoritních proteinů viru hepatitidy typu C v hostitelském organismu.

7. Seznam citované literatury

- Ahlquist, P., Noueiry, A. O., Lee, W. M., Kushner, D. B. a Dye, B. T. (2003). Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *Journal of Virology* 77, 8181-8186.
- Appel, N., Pietschmann, T. a Bartenschlager, R. (2005). Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: Potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *Journal of Virology* 79, 3187-3194.
- Baril, M. a Brakier-Gingras, L. (2005). Translation of the F protein of hepatitis C virus is initiated at a non-AUG codon in a +1 reading frame relative to the polyprotein. *Nucleic Acids Res* 33, 1474-1486.
- Bartenschlager, R., Frese, M. a Pietschmann, T. (2004). Novel Insights into Hepatitis C Virus Replication and Persistence. In *Advances in Virus Research*, pp. 71-180.
- Boehringer, D., Thermann, R., Ostareck-Lederer, A., Lewis, J. D. a Stark, H. (2005). Structure of the hepatitis C virus IRES bound to the human 80S ribosome: Remodeling of the HCV IRES. *Structure* 13, 1695-1706.
- Boulant, S., Becchi, M., Penin, F. a Lavergne, J. P. (2003). Unusual multiple recoding events leading to alternative forms of hepatitis C virus core protein from genotype 1b. *J Biol Chem* 278, 45785-45792.
- Boulant, S., Vanbelle, C., Ebel, C., Penin, F. a Lavergne, J. P. (2005). Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *Journal of Virology* 79, 11353-11365.
- Boumlic, A., Nomine, Y., Charbonnier, S., Dalagiorgou, G., Vassilaki, N., Kieffer, B., Trave, G., Mavromara, P. a Orfanoudakis, G. (2010). Prevalence of intrinsic disorder in the hepatitis C virus ARFP/Core+1/S protein. *FEBS J* 277, 774-789.
- Boumlic, A., Vassilaki, N., Dalagiorgou, G., Kochlios, E., Kakkanas, A., Georgopoulou, U., Markoulatos, P., Orfanoudakis, G. a Mavromara, P. (2011). Internal translation initiation stimulates expression of the ARF/core+1 open reading frame of HCV genotype 1b. *Virus Res* 155, 213-220.
- Branch, A. D., Stump, D. D., Gutierrez, J. A., Eng, F. a Walewski, J. L. (2005). The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: The alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin Liver Dis* 25, 105-117.
- Brass, V., Bieck, E., Montserret, R., Wölk, B., Hellings, J. A., Blum, H. E., Penin, F. a Moradpour, D. (2002). An amino-terminal amphipathic α -helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *Journal of Biological Chemistry* 277, 8130-8139.
- Braun, B. C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P. M., Finley, D. a Schmidt, M. (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nature Cell Biology* 1, 221-226.

- Bressanelli, S., Tomei, L., Roussel, A., Incitti, I., Vitale, R. L., Mathieu, M., De Francesco, R. a Rey, F. A.** (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 13034-13039.
- Budkowska, A., Kakkanas, A., Nerrienet, E., Kalinina, O., Maillard, P., Horm, S. V., Dalagiorgou, G., Vassilaki, N., Georgopoulou, U., Martinot, M., Sall, A. A. a Mavromara, P.** (2011). Synonymous mutations in the core gene are linked to unusual serological profile in hepatitis C virus infection. *PLoS One* 6, e15871.
- Cagney, G., Uetz, P. a Fields, S.** (2002). Two-hybrid analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* 26S proteasome. *Physiological Genomics* 2002, 27-34.
- Callens, N., Ciczora, Y., Bartosch, B., Vu-Dac, N., Cosset, F.-L., Pawlotsky, J.-M., Penin, F. a Dubuisson, J.** (2005). Basic Residues in Hypervariable Region 1 of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Contribute to Virus Entry. *J Virol* 79, 15331-15341.
- Carrère-Kremer, S., Montpellier-Pala, C., Cocquerel, L., Wychowski, C., Penin, F. a Dubuisson, J.** (2002). Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *Journal of Virology* 76, 3720-3730.
- Cook, G. A. a Opella, S. J.** (2010). Secondary structure, dynamics, and architecture of the p7 membrane protein from hepatitis C virus by NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* *In Press, Corrected Proof*.
- Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y. S., Rice, C. M. a Dubuisson, J.** (1997). Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *Journal of Virology* 71, 697-704.
- Dubuisson, J.** (2007). Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol* 13, 2406-2415.
- Dubuisson, J., Penin, F. a Moradpour, D.** (2002). Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. *Trends in Cell Biology* 12, 517-523.
- Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D. a Bienz, K.** (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *Journal of Virology* 76, 5974-5984.
- Einav, S., Elazar, M., Danieli, T. a Glenn, J. S.** (2004). A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4b mediates HCV RNA replication. *Journal of Virology* 78, 11288-11295.
- Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., Purcell, R. H., Alter, H. J. a Holland, P. V.** (1975). Transfusion-Associated Hepatitis Not Due to Viral Hepatitis Type A or B. *New England Journal of Medicine* 292, 767-770.
- Feld, J. J. a Hoofnagle, J. H.** (2005). Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* 436, 967-972.
- Foster, T. L., Tedbury, P. R., Pearson, A. R. a Harris, M.** (2010). A comparative analysis of the fluorescence properties of the wild-type and active site mutants of the hepatitis C virus autoprotease NS2-3. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1804, 212-222.

- Franck, N., Le Seyec, J., Guguen-Guillouzo, C. a Erdtmann, L.** (2005). Hepatitis C virus NS2 protein is phosphorylated by the protein kinase CK2 and targeted for degradation to the proteasome. *Journal of Virology* 79, 2700-2708.
- Gallei, A., Widauer, S., Thiel, J. H. a Becher, P.** (2006). Mutations in the palm region of a plus-strand RNA virus polymerase result in attenuated phenotype. *Journal of General Virology* 87, 3631-3636.
- Ghadge, G. D., Ma, L., Sato, S., Kim, J. a Roos, R. P.** (1998). A protein critical for a Theiler's virus-induced immune system-mediated demyelinating disease has a cell type-specific antiapoptotic effect and a key role in virus persistence. *Journal of Virology* 72, 8605-8612.
- Glickman, M. H. a Ciechanover, A.** (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction. *Physiological Reviews* 82, 373-428.
- Goffard, A. a Dubuisson, J.** (2003). Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins. *Biochimie* 85, 295-301.
- Griffin, S. D. C., Beales, L. P., Clarke, D. S., Worsfold, O., Evans, S. D., Jaeger, J., Harris, M. P. G. a Rowlands, D. J.** (2003). The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Letters* 535, 34-38.
- Hayashi, J., Furusyo, N., Ariyama, I., Sawayama, Y., Etoh, Y. a Kashiwagi, S.** (2000). A relationship between the evolution of hepatitis C virus variants, liver damage, and hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C viremia. *Journal of Infectious Diseases* 181, 1523-1527.
- Hellen, C. U. T.** (2009). IRES-induced conformational changes in the ribosome and the mechanism of translation initiation by internal ribosomal entry. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1789, 558-570.
- Himeda, T., Ohara, Y., Asakura, K., Kontani, Y. a Sawada, M.** (2005). A lentiviral expression system demonstrates that L* protein of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) has an anti-apoptotic effect in a macrophage cell line. *Microbial Pathogenesis* 38, 201-207.
- Choi, J., Xu, Z. a Ou, J. H.** (2003). Triple decoding of hepatitis C virus RNA by programmed translational frameshifting. *Mol Cell Biol* 23, 1489-1497.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. a Houghton, M.** (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244, 359-362.
- Choo, Q. L., Richman, K. H., Han, J. H., Berger, K., Lee, C., Dong, C., Gallegos, C., Coit, D., Medina-Selby, A., Barr, P. J., Weiner, A. J., Bradley, D. W., Kuo, G. a Houghton, M.** (1991). Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 2451-2455.
- Ina, Y., Mizokami, M., Ohba, K. a Gojobori, T.** (1994). Reduction of synonymous substitutions in the core protein gene of hepatitis C virus. *J Mol Evol* 38, 50-56.

- Irshad, M. a Dhar, I.** (2006). Hepatitis C virus core protein: An update on its molecular biology, cellular functions and clinical implications. *Medical Principles and Practice* 15, 405-416.
- Johnston, S. C., Whitby, F. G., Realini, C., Rechsteiner, M. a Hill, C. P.** (1997). The proteasome 11S regulator subunit REG α (PA28 α) is a heptamer. *Protein Science* 6, 2469-2473.
- Kalejta, R. F. a Shenk, T.** (2003). Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of the Rb family of tumor suppressors by the human cytomegalovirus pp71 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 3263-3268.
- Kim, Y. K., Lee, S. H., Kim, C. S., Seol, S. K. a Jang, S. K.** (2003). Long-range RNA-RNA interaction between the 5' nontranslated region and the core-coding sequences of hepatitis C virus modulates the IRES-dependent translation. *RNA* 9, 599-606.
- Komurian-Pradel, F., Rajoharison, A., Berland, J. L., Khouri, V., Perret, M., Van Roosmalen, M., Pol, S., Negro, F. a Paranhos-Baccalà, G.** (2004). Antigenic relevance of F protein in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 40, 900-909.
- La Rocca, S. A., Herbert, R. J., Crooke, H., Drew, T. W., Wileman, T. E. a Powell, P. P.** (2005). Loss of interferon regulatory factor 3 in cells infected with classical swine fever virus involves the N-terminal protease, Npro. *Journal of Virology* 79, 7239-7247.
- Li, X. D., Sun, L., Seth, R. B., Pineda, G. a Chen, Z. J.** (2005). Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 17717-17722.
- Lindenbach, B. D. a Rice, C. M.** (2005). Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 436, 933-938.
- Lo, S.-Y., Masiarz, F., Hwang, S. B., Lai, M. M. C. a Ou, J.-H.** (1995). Differential Subcellular Localization of Hepatitis C Virus Core Gene Products. *Virology* 213, 455-461.
- Lo, S.-Y., Selby, M., Tong, M. a Ou, J.-H.** (1994). Comparative Studies of the Core Gene Products of Two Different Hepatitis C Virus Isolates: Two Alternative Forms Determined by a Single Amino Acid Substitution. *Virology* 199, 124-131.
- Lundin, M., Monné, M., Widell, A., Von Heijne, G. a Persson, M. A. A.** (2003). Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *Journal of Virology* 77, 5428-5438.
- Martell, M., Esteban, J. I., Quer, J., Genesca, J., Weiner, A., Esteban, R., Guardia, J. a Gomez, J.** (1992). Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: Quasispecies nature of HCV genome distribution. *Journal of Virology* 66, 3225-3229.
- McLauchlan, J.** (2000). Properties of the hepatitis C virus core protein: A structural protein that modulates cellular processes. *Journal of Viral Hepatitis* 7, 2-14.

- McMullan, L. K., Grakoui, A., Evans, M. J., Mihalik, K., Puig, M., Branch, A. D., Feinstone, S. M. a Rice, C. M.** (2007). Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 2879-2884.
- Medina, M., Domingo, E., Brangwyn, J. K. a Belsham, G. J.** (1993). The two species of the foot-and-mouth disease virus leader protein, expressed individually, exhibit the same activities. *Virology* *194*, 355-359.
- Mellor, J., Holmes, E. C., Jarvis, L. M., Yap, P. L., Simmonds, P., Conradie, J. D., Neill, A. G. N., Dusheiko, G. M., Kew, M. C., Koshy, A., Lin, C. K., Lai, C. L., Murray-Lyon, I., Gunaid, A. A., El-Guneid, A. M., Mutimer, D., Ahamed, M., Nuchprayoon, C. a Tamprasert, S.** (1995). Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: Implications for virus classification. *Journal of General Virology* *76*, 2493-2507.
- Meuleman, P. a Leroux-Roels, G.** (2008). The human liver-uPA-SCID mouse: A model for the evaluation of antiviral compounds against HBV and HCV. *Antiviral Research* *80*, 231-238.
- Miller, C. L. a Pintel, D. J.** (2001). The NS2 protein generated by the parvovirus minute virus of mice is degraded by the proteasome in a manner independent of ubiquitin chain elongation or activation. *Virology* *285*, 346-355.
- Moradpour, D., Penin, F. a Rice, C. M.** (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nature Reviews Microbiology* *5*, 453-463.
- Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A. a Chandu, D.** (2006). The ubiquitin-proteasome system. *Journal of Biosciences* *31*, 137-155.
- Ogata, S., Nagano-Fujii, M., Ku, Y., Yoon, S. a Hotta, H.** (2002). Comparative sequence analysis of the core protein and its frameshift product, the F protein, of hepatitis C virus subtype 1b strains obtained from patients with and without hepatocellular carcinoma. *Journal of Clinical Microbiology* *40*, 3625-3630.
- Pallaoro, M., Lahm, A., Biasiol, G., Brunetti, M., Nardella, C., Orsatti, L., Bonelli, F., Orrù, S., Narjes, F. a Steinkühler, C.** (2001). Characterization of the hepatitis C virus NS2/3 processing reaction by using a purified precursor protein. *Journal of Virology* *75*, 9939-9946.
- Pang, P. S., Jankowsky, E., Planet, P. J. a Pyle, A. M.** (2002). The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding. *EMBO Journal* *21*, 1168-1176.
- Pezacki, J. P., Singaravelu, R. a Lyn, R. K.** (2010). Host-virus interactions during hepatitis C virus infection: A complex and dynamic molecular biosystem. *Molecular BioSystems* *6*, 1131-1142.
- Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M., Cosset, F. L. a Bartenschlager, R.** (2006). Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 7408-7413.

- Poynard, T., Yuen, M. F., Ratziu, V. a Lung Lai, C.** (2003). Viral hepatitis C. *Lancet* 362, 2095-2100.
- Ratinier, M., Boulant, S., Combet, C., Targett-Adams, P., McLauchlan, J. a Lavergne, J. P.** (2008). Transcriptional slippage prompts recoding in alternate reading frames in the hepatitis C virus (HCV) core sequence from strain HCV-1. *Journal of General Virology* 89, 1569-1578.
- Ratinier, M., Boulant, S., Crussard, S., McLauchlan, J. a Lavergne, J. P.** (2009). Subcellular localizations of the hepatitis C virus alternate reading frame proteins. *Virus Res* 139, 106-110.
- Roccasecca, R., Ansuini, H., Vitelli, A., Meola, A., Scarselli, E., Acali, S., Pezzanera, M., Ercole, B. B., McKeating, J., Yagnik, A., Lahm, A., Tramontano, A., Cortese, R. a Nicosia, A.** (2003). Binding of the Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein to CD81 Is Strain Specific and Is Modulated by a Complex Interplay between Hypervariable Regions 1 and 2. *J Virol* 77, 1856-1867.
- Rouillé, Y., Helle, F., Delgrange, D., Roingeard, P., Voisset, C., Blanchard, E., Belouzard, S., McKeating, J., Patel, A. H., Maertens, G., Wakita, T., Wychowski, C. a Dubuisson, J.** (2006). Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *Journal of Virology* 80, 2832-2841.
- Roussel, J., Pillez, A., Montpellier, C., Duverlie, G., Cahour, A., Dubuisson, J. a Wychowski, C.** (2003). Characterization of the expression of the hepatitis C virus F protein. *Journal of General Virology* 84, 1751-1759.
- Rullier, A., Trimoulet, P., Urbaniak, R., Winnock, M., Zauli, D., Ballardini, G., Rosenbaum, J., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P. a Le Bail, B.** (2001). Immunohistochemical detection of HCV in cirrhosis, dysplastic nodules, and hepatocellular carcinomas with parallel-tissue quantitative RT-PCR. *Modern Pathology* 14, 496-505.
- Rumenapf, T., Stark, R., Heimann, M. a Thiel, H. J.** (1998). N-terminal protease of pestiviruses: Identification of putative catalytic residues by site-directed mutagenesis. *Journal of Virology* 72, 2544-2547.
- Sakai, A., St. Claire, M., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S. U., Purcell, R. H. a Bukh, J.** (2003). The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 11646-11651.
- Santolini, E., Migliaccio, G. a La Monica, N.** (1994). Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *Journal of Virology* 68, 3631-3641.
- Serebrov, V. a Pyle, A. M.** (2004). Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase. *Nature* 430, 476-480.
- Sharma, S. D.** (2010). Hepatitis C virus: molecular biology & current therapeutic options. *Indian J Med Res* 131, 17-34.

- Sheaff, R. J., Singer, J. D., Swanger, J., Smitherman, M., Roberts, J. M. a Clurman, B. E.** (2000). Proteasomal turnover of p21(Cip1) does not require p21(Cip1) ubiquitination. *Molecular Cell* 5, 403-410.
- Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deléage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspé, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D. G., Okamoto, H., Pawlotsky, J. M., Penin, F., Sablon, E., Shin-I, T., Stuyver, L. J., Thiel, H. J., Viazov, S., Weiner, A. J. a Widell, A.** (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42, 962-973.
- Simmonds, P., Tuplin, A. a Evans, D. J.** (2004). Detection of genome-scale ordered RNA structure (GORS) in genomes of positive-stranded RNA viruses: Implications for virus-evolution and host persistence. *RNA* 10, 1337-1351.
- Smith, D. B. a Simmonds, P.** (1997). Characteristics of nucleotide substitution in the hepatitis C virus genome: constraints on sequence change in coding regions at both ends of the genome. *J Mol Evol* 45, 238-246.
- Soussan, P., Garreau, F., Zylberberg, H., Ferray, C., Brechot, C. a Kremsdorf, D.** (2000). In vivo expression of a new hepatitis B virus protein encoded by a spliced RNA. *Journal of Clinical Investigation* 105, 55-60.
- Soussan, P., Tuveri, R., Nalpas, B., Garreau, F., Zavala, F., Masson, A., Pol, S., Brechot, C. a Kremsdorf, D.** (2003). The expression of hepatitis B spliced protein (HBSP) encoded by a spliced hepatitis B virus RNA is associated with viral replication and liver fibrosis. *Journal of Hepatology* 38, 343-348.
- Spahn, C. M. T., Kieft, J. S., Grassucci, R. A., Penczek, P. A., Zhou, K., Doudna, J. A. a Frank, J.** (2001). Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40S ribosomal subunit. *Science* 291, 1959-1962.
- Tang, H. a Grise, H.** (2009). Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. *Clin Sci (Lond)* 117, 49-65.
- Tellinghuisen, T. L., Marcotrigiano, J., Gorbalenya, A. E. a Rice, C. M.** (2004). The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *Journal of Biological Chemistry* 279, 48576-48587.
- Tellinghuisen, T. L., Marcotrigiano, J. a Rice, C. M.** (2005). Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* 435, 374-379.
- Tellinghuisen, T. L. a Rice, C. M.** (2002). Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Current Opinion in Microbiology* 5, 419-427.
- Troesch, M., Jalbert, E., Canobio, S., Boulassel, M. R., Routy, J. P., Bernard, N. F., Bruneau, J., Lapointe, N., Boucher, M. a Soudeyns, H.** (2005). Characterization of humoral and cell-mediated immune responses directed against hepatitis C virus F protein in subjects co-infected with hepatitis C virus and HIV-1. *AIDS* 19, 775-784.
- Tuplin, A., Evans, D. J. a Simmonds, P.** (2004). Detailed mapping of RNA secondary structures in core and NS5B-encoding region sequences of hepatitis C virus by RNase cleavage and novel bioinformatic prediction methods. *J Gen Virol* 85, 3037-3047.

- Tuplin, A., Wood, J., Evans, D. J., Patel, A. H. a Simmonds, P.** (2002). Thermodynamic and phylogenetic prediction of RNA secondary structures in the coding region of hepatitis C virus. *RNA* 8, 824-841.
- Uversky, V. N.** (2002). What does it mean to be natively unfolded? *European Journal of Biochemistry* 269, 2-12.
- Van Regenmortel, M. H., International a Fauquet, C. M.** (2000). *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Academic Press).
- Varaklioti, A., Vassilaki, N., Georgopoulou, U. a Mavromara, P.** (2002). Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. *J Biol Chem* 277, 17713-17721.
- Vassilaki, N., Boleti, H. a Mavromara, P.** (2007). Expression studies of the core+1 protein of the hepatitis C virus 1a in mammalian cells. The influence of the core protein and proteasomes on the intracellular levels of core+1. *FEBS J* 274, 4057-4074.
- Vassilaki, N., Boleti, H. a Mavromara, P.** (2008a). Expression studies of the HCV-1a core+1 open reading frame in mammalian cells. *Virus Res* 133, 123-135.
- Vassilaki, N., Friebe, P., Meuleman, P., Kallis, S., Kaul, A., Paranhos-Baccala, G., Leroux-Roels, G., Mavromara, P. a Bartenschlager, R.** (2008b). Role of the hepatitis C virus core+1 open reading frame and core cis-acting RNA elements in viral RNA translation and replication. *J Virol* 82, 11503-11515.
- Vassilaki, N. a Mavromara, P.** (2003). Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/F/core+1 coding open reading frame. *J Biol Chem* 278, 40503-40513.
- Vassilaki, N. a Mavromara, P.** (2009). The HCV ARFP/F/core+1 protein: production and functional analysis of an unconventional viral product. *IUBMB Life* 61, 739-752.
- Verma, R., Oania, R., Graumann, J. a Deshaies, R. J.** (2004). Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell* 118, 99-110.
- Walewski, J. L., Gutierrez, J. A., Branch-Elliman, W., Stump, D. D., Keller, T. R., Rodriguez, A., Benson, G. a Branch, A. D.** (2002). Mutation Master: profiles of substitutions in hepatitis C virus RNA of the core, alternate reading frame, and NS2 coding regions. *RNA* 8, 557-571.
- Walewski, J. L., Keller, T. R., Stump, D. D. a Branch, A. D.** (2001). Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* 7, 710-721.
- Walewski, J. L., Stump, D. D., Keller, T. R. a Branch, A. D.** (1998). HCV patients have antibodies against a novel protein encoded in a second reading frame. *Hepatology* 28, 462.
- Wang, C., Sarnow, P. a Siddiqui, A.** (1993). Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *Journal of Virology* 67, 3338-3344.

- Wolf, M., Dimitrova, M., Baumert, T. F. a Schuster, C.** (2008). The major form of hepatitis C virus alternate reading frame protein is suppressed by core protein expression. *Nucleic Acids Research* 36, 3054-3064.
- Wölk, B., Sansonno, D., Kräusslich, H. G., Dammacco, F., Rice, C. M., Blum, H. E. a Moradpour, D.** (2000). Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *Journal of Virology* 74, 2293-2304.
- Xu, Z., Choi, J., Lu, W. a Ou, J. H.** (2003). Hepatitis C virus F protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology* 77, 1578-1583.
- Xu, Z., Choi, J., Yen, T. S., Lu, W., Strohecker, A., Govindarajan, S., Chien, D., Selby, M. J. a Ou, J.** (2001). Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J* 20, 3840-3848.
- Yuksek, K., Chen, W. L., Chien, D. a Ou, J. H.** (2009). Ubiquitin-independent degradation of hepatitis C virus F protein. *J Virol* 83, 612-621.
- Hepatitis Virus Database Server** (2011) [online]. [citováno 21. 1. 2011]. Dostupné z WWW: <<http://s2as02.genes.nig.ac.jp/>>